

**CAROLINA WEIGERT GALVÃO**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS  
RecA E RecX DE *Herbaspirillum seropedicae***

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências, Área Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências, área de Bioquímica.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Berenice Reynaud Steffens**

**Co-orientadora : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Satie Chubatsu**

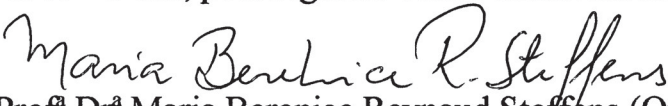
**CURITIBA  
2005**


## TERMO DE APROVAÇÃO

**CAROLINA WEIGERT GALVÃO**

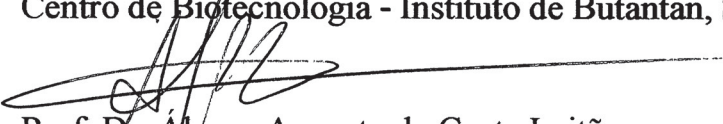
### **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS RecA E RecX DE *Herbaspirillum seropedicae***


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora.

  
Profª Drª Maria Berenice Reynaud Steffens (Orientadora)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

  
Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

  
Profª Drª Elizabeth Angélica Leme Martins  
Centro de Biotecnologia - Instituto de Butantan, SP

  
Prof. Dr. Alvaro Augusto da Costa Leitão  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

  
Prof. Dr. Hernán Terenzi  
Departamento de Bioquímica - UFSC

Curitiba, 11 de julho de 2005.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Maria Berenice Reynaud Steffens, pela coragem de ter aceito o desafio de iniciar o estudo do gene *recA*, há quase 15 anos, num grupo com experiência e conhecimento no metabolismo de nitrogênio. Obrigada por ter me adotado como sua filha primogênita e confiar a mim a sua herança científica. Sua disponibilidade irrestrita, apoio, orientação e cumplicidade sempre me deram e me dão força para consertar os erros cometidos no meio do caminho e seguir em frente.

Ao professor Emanuel Maltempi de Souza, por ser o meu exemplo. Profissional dedicado; orientador exigente, crítico e criativo; ser humano humilde, honesto e com um carácter fora de série; professor inteligente e atencioso; pesquisador ambicioso e completamente apaixonado pelo que faz. Obrigada por toda a sua paciência, credibilidade, apoio e estímulo durante todos estes anos de aprendizado ao seu lado.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa, por ter permitido que um grupo de estudantes de biologia, do qual eu fazia parte, viesse a compor o Núcleo de Fixação de Nitrogênio. Obrigada pela oportunidade de desenvolver pesquisa num laboratório com tamanha infra-estrutura e com uma equipe excepcional.

À professora Leda Satie Chubatsu, pelas idéias, críticas e sugestões recebidas durante a execução e redação desta tese. Obrigada pelo seu exemplo de dedicação ao trabalho e à família.

Ao professor Geoff Yates pelas idéias, segurança, conhecimento e confiança. Obrigada por ter me dado a oportunidade de admirá-lo não só pela sua capacidade profissional.

À professora Glaci Zancan, por sua dedicação à pesquisa e à formação de novos profissionais. Obrigada por compartilhar um pouco da sua experiência de vida e do seu conhecimento científico.

Ao professor Martin Buck, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa por seis meses. Obrigada pelas conversas, idéias e principalmente pela lição de simplicidade e humildade. Gostaria de agradecer também a todos os componentes de seu grupo - Patricia Bordes, Patricia Burrows, Goran Jovanovic, Sivaramesh Wigneshweraraj, Antony Mayhew, e principalmente ao Jorg Schumacher, pelo seu interesse e sua sempre pronta disponibilidade para discussões.

Ao Hajime Niwa, por ter dividido um pouco do seu conhecimento de cristalografia comigo, por sua imensa paciência, estímulo e idéias. Sua doação incondicional ao trabalho de colegas contribuiu tanto para o meu desenvolvimento profissional quanto pessoal.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pelo conhecimento compartilhado. Deixo um agradecimento especial à Liu Un Rigo e à Elaine Benelli, pela leitura do projeto e dos relatórios e pelas sugestões, e ao David Mitchell, pela colaboração na discussão dos gráficos e pelas idéias de projetos futuros.

À Roseli Wassem e à Rose Adele Monteiro, pelas sugestões e pelo apoio. Vê-las como professoras da UFPR hoje, depois de termos compartilhado o papel de estudantes nessa Universidade, me mostra que dedicação e esforço são recompensados.

Aos coordenadores que estiveram à frente do Curso de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular durante o período da minha titulação e à Dona Marilza pela colaboração dispensada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio ao Núcleo de Excelência (PRONEX - MCT, FINEP, CNPq) e à Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), pelo suporte financeiro.

À Dona Jú, à Rose Prado e ao Valter, pela generosidade, competência e carinho. Agradeço especialmente ao Valtinho, pelos ensinamentos, segurança e ajuda incondicional nas purificações de proteína.

Às bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas e a todo pessoal do biotério pela colaboração e gentileza.

Ao Geraldo Picheth, à Cyntia Picheth e ao Salah Aljanabi, pela simpatia, carinho, estímulo e irrestrito apoio.

Às colegas de trabalho, que se tornaram amigas de coração Andréa, Fabi e Lauren, e aos meus amigos de longa data Caro(e), Karen e Rodrigo por todo o carinho, atenção e as conversas gostosas.

Ao Stefan, por todo o seu carinho, apoio e respeito às minhas decisões. Obrigada por me fazer sentir parte da sua família e promover a conexão entre mim e

peessoas super especiais como o seu pai, sua irmã e, é claro, a sua sobrinha, a picurrucha Gabriela, que me encanta e me inspira cada dia mais.

Ao Luciano, por toda a segurança recebida desde os tempos da graduação, pelo seu companheirismo e idéias.

Aos meus colegas de mestrado, que se tornaram meus colegas de doutorado, Adriano, Lilian, Andréa, Alan, Carol, Rose, Ana Paula, Paulinha, e, aos colegas de laboratório, Ana Cláudia, Jú Inaba, Marcelo (fumaça), Marceleza, Helisson, Lys, Giovana, Léo, Gus, Patilene, Rose Adele, Michelle Tadra, Eliel e Adrianas, pela troca de conhecimento e pelos momentos de descontração e bagunça. Agradeço especialmente a Fabi, a Luíza e a Dani, pelas sugestões e todas as ajudas DNAsísticas e protéicas.

Aos meus companheiros da sala 279, André, Rafa, Humberto e Michelle Hudson, pelas conversas científicas e descontraídas do dia a dia.

Ao Angel, pelo companherismo e segurança durante o nosso estágio sanduíche. Obrigada por dividir comigo o seu conhecimento, sua humildade e principalmente sua história de vida. É muito bom saber que agora tenho um irmãozinho no México e também que há alguém mais bravo do que eu!!!!

Aos amigos Vicente, Alex, Cláudia e em especial ao Carsten e aos colegas do Departamento de Ciências Biológicas (Imperial College), Costas, Kas e Yanis, pela companhia, pelos cuidados e pela atenção. Obrigada pelos momentos de diversão e pelas conversas intelectuais que, ao mesmo tempo que me mostraram o quão aquém eu estou em termos de cultura, domínio de línguas e experiência de vida, me fizeram sentir especial por fazer parte do cotidiano de vocês. O negócio é correr em busca do tempo perdido!!!

À Sue, minha companheira de apartamento em Londres, por me fazer valorizar ainda mais a minha família. Obrigada por ter tornado o Imperial College um local menos estressante do que a minha casa em Londres. As horas de laboratório se tornaram mais longas e mais prazerosas.

À minha professora de natação, a Fer, por ter lutado bravamente contra os quilos a mais que foram se acumulando, como consequência das delícias da minha segunda mãe e super cozinheira, a Marizinha, e da gulodice de mais de três meses enfurnada em casa.

A minha Vó Odette, pelas orações e pelo seu amor cego, surdo e mudo. Obrigada por toda a sua confiança, mesmo que essa desperte em mim o medo de a decepcionar. Obrigada por me permitir estar sempre muito próxima a você.

Ao meu Vô Derblay, por todo o seu carinho, sua preocupação e sua participação na realização dos meus sonhos. Obrigada pelo seu apoio incondicional.

À família Galvão Veiga Barros, o Fer, o Pepezinho, a Julinha e especialmente a Tatazinha, pelo exemplo de alegria, união e cumplicidade. Obrigada por todo o carinho, apoio, puxões de orelha e, é claro, super conselhos.

À família Weigert, especialmente a vó Inês, a tia Bea, o Guta, a Quel e a tia Taim, pelo carinho e amor. Mais uma vez as minhas tias Taim e Bea me salvaram das dificuldades dessa língua portuguesa. Muito muito obrigada.

Ao Markus, pela persistência, paciência e total doação. Obrigada por abrir meus horizontes e me prover de tanta segurança, atenção e amor. Agradeço também por todo o seu suporte no quesito computador, desde o *download* de programas úteis para esse trabalho, até as muitas horas de ensinamentos quanto à forma de executá-los.

À família Weigert Galvão, por suportar minhas tristezas doando-me todo o carinho e atenção; por suportar meu mau-humor, respeitando o meu espaço; por alimentar os meus sonhos, fazendo-me acreditar que eu poderia realizá-los. É muito bom se sentir bem vinda e receber o carinho de vocês ao chegar em casa. Amo vocês!!! Pai, agradeço por ter-me imposto sempre tantos desafios e principalmente por ter-me servido de inspiração e estímulo para vencê-los. Muito obrigada pela sua preocupação e participação em todos os momentos da minha vida. Mami, agradeço muito por sua paciência, seu conforto e todo o seu amor. Minha ouvinte, minha conselheira, minha protetora, minha paz, minha luz, minha mãe, graças à Deus, minha

mãe... Obrigada por ser o nosso equilíbrio e por manter a nossa família tão unida. Ferzinha, agradeço pelo seu companheirismo, sua cumplicidade e toda essa sua alegria. Toda essa sua generosidade e afeto me incentivam a melhorar a cada dia, para me tornar, quem sabe um dia, merecedora de uma irmã como você. Rafa, agradeço pela sua paciência, por toda a sua atenção no período em que eu estive longe, e principalmente por ter tomado o meu posto de alvo número um das críticas paternais.

Ao meu Anjinho da Guarda, por colocar pessoas tão maravilhosas na minha vida e me proporcionar tantos momentos de felicidade e realização profissional e pessoal.

---

“Mesmo que nossos projetos não tenham se  
realizado inteiramente, temos que ser generosos  
com nossos avanços e saber que o sonho sempre  
será maior que nossas conquistas”.

Gikovate



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIII
RESUMO .....	XIV
ABSTRACT .....	XV
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Envolvimento da proteína RecA nos processos de Recombinação Homóloga, Resposta SOS e Mutagênese SOS .....	5
2.1.1 Recombinação Homóloga .....	5
2.1.1.1 Vias de Reparo por Recombinação .....	6
2.1.2 Resposta SOS .....	12
2.1.3 Mutagênese SOS .....	13
2.2 Atividades da proteína RecA .....	16
2.2.1 Ligação ao DNA .....	16
2.2.2 Troca de fitas homólogas de DNA .....	19
2.2.3 Atividade ATPásica .....	21
2.2.3.1 Troca de fitas x Hidrólise de ATP .....	26
2.3 Estrutura da proteína RecA .....	27
2.3.1 Sítios de ligação do DNA .....	31
2.3.2 Sítios de ligação e hidrólise de ATP .....	32
2.3.2.1 Motivo Walker A .....	32
2.3.2.2 Motivo Walker B .....	33
2.3.3 Motivo MAW ( <i>Make ATP Work</i> ) .....	33
2.3.4 Região de interface dos oligômeros .....	34
2.3.5 Domínio C-terminal .....	35
2.3.6 Regulação alostérica da atividade da proteína RecA (Integração funcional dos domínios de RecA) .....	36
2.4 Proteínas Homólogas à RecA bacteriana .....	37
2.5 Envolvimento de outras proteínas na modulação da atividade da proteína RecA .....	40
2.5.1 Proteína ligadora de DNA simples-fita (SSB) .....	40
2.5.2 Proteínas RecF, RecO e RecR .....	41
2.5.3 Complexo RecBCD .....	41
2.5.4 LexA .....	43
2.5.5 DNA polimerase V .....	44
2.5.6 DinI .....	44
2.5.7 RecX .....	45
2.5.7.1 Análises funcional do gene <i>recX</i> .....	46
2.5.7.2 Análises <i>in vitro</i> da proteína RecX .....	47
2.5.7.3 Análises <i>in silico</i> da proteína RecX .....	49

2.6	Caracterização do operon <i>recArecX</i> e identificação de outros genes envolvidos nos processos de recombinação e reparo SOS em <i>H. seropedicae</i> .....	52
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
3.1	Materiais Gerais .....	54
3.1.1	Composição dos Meios de Cultura .....	54
3.1.2	Soluções e Reagentes .....	55
3.1.3	Estirpes de bactérias e plasmídeos .....	57
3.1.4	DNA .....	59
3.1.5	Reagentes e proteínas .....	60
3.2	Métodos Gerais para DNA .....	60
3.2.1	Manipulação do DNA .....	61
3.2.2	Eletroforese de DNA em gel de agarose ou ágar .....	61
3.2.3	Transformação bacteriana por Eletroporação .....	62
3.2.4	Amplificação do DNA .....	63
3.2.5	Mutagenese sítio-dirigida .....	64
3.2.6	Seqüenciamento de DNA .....	66
3.2.6.1	Reação de seqüenciamento de DNA .....	66
3.2.6.2	Purificação do produto da reação de seqüenciamento .....	66
3.2.6.3	Edição e Análise das seqüências .....	66
3.2.7	Purificação de DNA simples-fita .....	67
3.2.8	Clonagem .....	68
3.2.8.1	Clonagem do gene <i>recA</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	68
3.2.8.2	Clonagem do gene <i>recX</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	70
3.3	Métodos Gerais para proteína .....	71
3.3.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante .....	71
3.3.2	Superexpressão das proteínas RecA e RecX de <i>H. seropedicae</i> .....	72
3.3.3	Purificação das proteínas .....	73
3.3.3.1	Purificação de proteína contendo cauda His .....	73
3.3.3.1.1	Cromatografia de afinidade utilizando metal imobilizado .....	73
3.3.3.2	Purificação de proteína nativa .....	74
3.3.3.2.1	Precipitação da proteína RecA com Polietilenoimina e Sulfato de Amônio .....	74
3.3.3.2.2	Cromatografia em DEAE-Sepharose .....	75
3.3.3.3	Cromatografia em SP-sepharose .....	76
3.3.4	Clivagem da proteína RecXHis com trombina .....	76
3.3.5	Estocagem das proteínas .....	78
3.3.6	Dosagem da concentração de proteína .....	78
3.3.7	Eletroforese de proteína em gel de agarose .....	78
3.3.8	Cristalização da proteína RecX .....	78
3.4	Ensaio <i>in vitro</i> .....	80
3.4.1	Ensaio de ligação das proteínas RecA e RecX ao DNA .....	80
3.4.1.1	Ensaio de ligação das proteínas RecA e RecX ao DNA marcado com [ <sup>32</sup> P] .....	80
3.4.1.2	Ensaio de ligação da proteína RecA e RecX ao DNA não marcado .....	81
3.4.2	Ligação covalente das proteínas RecA e RecX com o DNA induzida por luz UV .....	82

3.4.3	Ensaios de interação proteína-proteína .....	83
3.4.3.1	Determinação da interação RecA-RecX utilizando resina de sepharose <i>chelating</i> FF.....	83
3.4.3.2	Determinação da interação RecA-RecX por eletroforese em duas dimensões (2D) .....	84
3.4.4	Ensaio de troca de fita de DNA .....	87
3.4.5	Ensaio de ligação do ATP.....	88
3.4.6	Ensaio de atividade ATPásica.....	89
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
4.1	Clonagem, Expressão e Purificação da proteína RecA.....	92
4.1.1	Clonagem e Expressão da proteína RecA.....	92
4.1.2	Purificação da proteína RecA .....	93
4.1.2.1	Purificação da proteína RecA ligada à cauda de histidina.....	93
4.1.2.2	Purificação da proteína RecA nativa.....	95
4.2	Clonagem, Expressão, Purificação e Cristalização da proteína RecX de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	96
4.2.1	Clonagem e Expressão da proteína RecX.....	96
4.2.2	Purificação e Cristalização da proteína RecX.....	96
4.2.2.1	Purificação da RecX ligada à cauda de histidina .....	97
4.2.2.2	RecX nativa.....	98
4.2.2.2.1	Purificação da proteína RecX nativa em coluna SP Sepharose .....	98
4.2.2.2.2	Clivagem do peptídeo N-terminal contendo a cauda His da proteína RecXHis.....	98
4.2.2.3	Cristalização da proteína RecX.....	99
4.3	Ensaios <i>in vitro</i> .....	100
4.3.1	Determinação da interação entre as proteínas RecA e RecX de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> .....	101
4.3.2	Atividade de ligação das proteínas RecX e RecA ao DNA .....	108
4.3.2.1	Atividade de ligação ao DNA da proteína RecA .....	108
4.3.2.2	Atividade de ligação ao DNA da proteína RecX.....	111
4.3.2.3	Efeito de RecX sobre a atividade de ligação ao DNA da proteína RecA.....	115
4.3.3	Troca de fitas de DNA mediada pela proteína RecA.....	119
4.3.3.1	Efeito da proteína RecX sobre a troca de fitas de DNA mediada pela proteína RecA .....	121
4.3.4	Atividade de ligação ao ATP da proteína RecA .....	123
4.3.4.1	Efeito da proteína RecX na atividade de ligação ao ATP da proteína RecA.....	125
4.3.5	Atividade de hidrólise de ATP (ATPásica) .....	125
4.3.5.1	Atividade ATPásica da proteína RecA .....	125
4.3.5.2	Efeito de RecX sobre a Atividade ATPásica da proteína RecA.....	128
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>139</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	140
	APÊNDICES .....	161

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Vias de reparo por recombinação envolvidas na restauração da forquilha de replicação diante de dupla quebra da forquilha de replicação (DSB) ou dupla quebra do DNA genômico.....	8
Figura 2.2 - Vias de reparo por recombinação envolvidas na restauração da forquilha de replicação diante de lesões ou outras barreiras.....	9
Figura 2.3 - Estrutura do filamento de RecA.....	10
Figura 2.4 - Modelo do mini-mutassomo.....	16
Figura 2.5 - Associação e dissociação do filamento de RecA no ssDNA.....	18
Figura 2.6 - Reação de troca de fitas promovida pela proteína RecA <i>in vitro</i> .....	20
Figura 2.7 - Ondas de hidrólise de ATP no filamento de RecA.....	24
Figura 2.8 - Coordenação das ondas de hidrólise de ATP no filamento de RecA.....	25
Figura 2.9 - Modelo de troca de fitas entre ssDNA e dsDNA no qual a rotação do DNA está acoplada à hidrólise de ATP.....	27
Figura 2.10 - Modelo estrutural da proteína RecA.....	29
Figura 2.11 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína RecA de diversos microrganismos.....	30
Figura 2.12 - Comparação entrutural dos domínios das proteínas RecA, UvsX, Rad51 e Dmc1.....	38
Figura 2.13 - Mecanismo molecular da formação de ssDNA mediado por RecBCD e <i>chi</i> .....	43
Figura 2.14 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína RecX de diversos microrganismos.....	50
Figura 2.15 - Modelo estrutural da proteína RecX.....	51
Figura 3.1 - Esquema da mutagênese sítio dirigida <i>Quickchange</i> .....	65
Figura 3.2 - Etapas do ensaio de interação proteína-proteína utilizando resina de sepharose ligada a íons $Ni^{2+}$ .....	84
Figura 3.3 - Esquema do ensaio de interação proteína-proteína utilizando eletroforese bidimensional.....	87
Figura 4.1 - Purificação das proteínas RecA e RecX de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	94
Figura 4.2 - Interação RecA-RecX de <i>H. seropedicae</i> demonstrada através de imobilização em resina de sepharose- $Ni^{2+}$ .....	103
Figura 4.3 - Demonstração da interação RecA-RecX de <i>H. seropedicae</i> através de eletroforese bidimensional - I.....	105
Figura 4.4 - Demonstração da interação RecA-RecX de <i>H. seropedicae</i> através de eletroforese bidimensional - II.....	106

Figura 4.5 - Ensaio de retardamento de migração de DNA de baixa massa molecular na presença da proteína RecA de <i>H. seropedicae</i> . ....	110
Figura 4.6 - Ensaio de retardamento de migração de DNA de alta massa molecular pela presença da proteína RecX de <i>H. seropedicae</i> . ....	112
Figura 4.7 - Ensaio de retardamento de migração de DNA de baixa massa molecular pela presença da proteína RecX de <i>H. seropedicae</i> . ....	114
Figura 4.8 - Efeito da proteína RecX sobre a atividade de ligação ao DNA da proteína reca.....	116
Figura 4.9 - Ligação covalente da proteína RecA e/ou RecX de <i>H. seropedicae</i> ao dsDNA derivatizado. ....	118
Figura 4.10 - Troca de fitas de DNA mediada pelas proteínas RecA de <i>H. seropedicae</i> e <i>E. coli</i> .....	120
Figura 4.11 - Efeito da proteína RecX na troca de fitas mediada pela proteína RecA. ....	122
Figura 4.12 - Ligação ao ATP da proteína RecA de <i>H. seropedicae</i> . ....	124
Figura 4.13 - Atividade ATPásica da proteína RecA de <i>H. seropedicae</i> . ....	127
Figura 4.14 - Efeito da proteína RecX sobre a atividade ATPásica dependente de ssDNA da proteína RecA de <i>H. seropedicae</i> . ....	129
Figura 4.15 - Efeito da ordem de adição da proteína RecX na inibição da atividade ATPásica dependente de ssDNA da proteína RecA.....	133
Figura 4.16 - Efeito da adição de ssdna na inibição da atividade atpásica dependente de ssDNA da proteína RecA pela proteína RecX. ....	135
Figura 4.17 - Modelo de inibição de RecA pela proteína RecX. ....	136

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 2.1 - Proteínas envolvidas na recombinação homóloga. ....	39
Tabela 3.1 - Composição dos meios de cultivo bacterianos.....	54
Tabela 3.2 - Antibióticos usados neste trabalho.....	55
Tabela 3.3 - Composição das soluções utilizadas neste trabalho.....	55
Tabela 3.4 - Composição dos tampões utilizados neste trabalho.....	56
Tabela 3.5 - Estirpes de bactérias hospedeiras e do bacteriófago usados neste trabalho. .....	57
Tabela 3.6 - Plasmídeos usados neste trabalho. ....	58
Tabela 3.7 - Composição dos géis de separação e de empilhamento utilizados nas análises por SDS-PAGE.....	71
Tabela 3.8 - Composição dos géis utilizados para separação das proteínas em condição nativa. ....	81

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APAB - brometo de 4-azidofenacil  
ATP - 5' trifosfato de adenosina  
Bq - Bequerel  
BSA - albumina de soro bovino  
CCD - cromatografia em camada delgada  
D. O. - densidade óptica  
ddNTP - 5' trifosfato de 2', 3' - didesoxinucleosídeo  
dNTP - 5' -trifosfato de 2' desoxinucleosídeos  
dsDNA - DNA dupla-fita (*double-strand DNA*)  
DTT - ditioneitol  
EcRecA e EcRecX - proteínas RecA e RecX de *E. coli*  
EDTA - ácido etileno diamino-tetra-acético  
EM - Microscopia eletrônica  
FPLC - cromatografia líquida de performance rápida (*Fast Performance Liquid Chromatography*)  
His - cauda N-terminal contendo 6 resíduos de histidinas  
HMK - sequência de aminoácidos reconhecida e fosforilada pela quinase de músculo cardíaco de boi (*bovine heart muscle kinase*)  
HsRecA e HsRecX - proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae*  
IPTG -  $\beta$ -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo  
kb - kilo base  
kDa - kilo Dalton  
kpb - kilo pares de bases  
MAW - motivo da proteína RecA (*Make ATP Work*)  
MtRecA e MtRecX - proteínas RecA e RecX de *M. tuberculosis*  
nt - nucleotídeos  
pb - pares de bases  
PCR - reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)  
PEG - polietileno glicol  
PEI - placa de celulose microcristalina ligada a polietilenamina modificada (*polyethilenimine-modified microcrystalline cellulose*)  
RBS - sítio de ligação de ribossomo (*ribosome-binding site*)  
RNA - ácido ribonucléico  
RNase - ribonuclease  
rpm - rotações por minuto  
SDS - dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)  
SSB - proteína ligadora de ssDNA (*single-stranded binding protein*)  
ssDNA - DNA simples-fita (*single-strand DNA*)  
UV - Ultra Violeta



## RESUMO

O reparo do DNA é um mecanismo essencial para a sobrevivência de todos os organismos, desde as formas de vida unicelulares até humanos. A proteína RecA bacteriana é um componente central no reparo de DNA pois induz indiretamente a expressão de proteínas envolvidas no reparo não mutagênico e mutagênico do DNA, reparo SOS e reparo por recombinação. RecX é uma proteína moduladora da atividade de RecA, mas o mecanismo ainda não é conhecido. Os genes *recA* e *recX* de *Herbaspirillum seropedicae* formam um único operon e as evidências indicam que RecX participa no reparo SOS, possivelmente modulando as atividades de RecA. Para determinar o envolvimento da proteína RecX na regulação das atividades de RecA, as proteínas RecA, RecA mutante L54Q ou L54Q G73A e RecX de *H. seropedicae* foram superexpressas em *E. coli*, purificadas nas suas formas nativas e/ou com cauda de resíduos de histina (His) e caracterizadas *in vitro*. A interação entre as proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae* (HsRecA e HsRecX) foi demonstrada através de ensaios de imobilização em resina de sepharose e eletroforese em duas dimensões. Ensaio de retardamento de migração eletroforética do DNA revelaram que as proteínas HsRecA e HsRecX são capazes de se ligar ao DNA de fita dupla e simples na ausência de ATP. HsRecX liga-se ao DNA fita dupla mesmo na presença de HsRecA. HsRecA também apresentou as atividades de ligação ao ATP, hidrólise de ATP e troca de fitas de DNA. A proteína HsRecX inibiu 90% da atividade de troca de fitas de HsRecA quando presente numa concentração molar 50 vezes menor do que HsRecA. A ligação do ATP à HsRecA não foi afetada pela presença de HsRecX porém a atividade ATPásica foi reduzida. Quando a proteína HsRecX estava presente antes da formação do filamento de RecA (HsRecA-ssDNA), a inibição dessa atividade ATPásica foi substancialmente reduzida, enquanto excesso de ssDNA suprimiu parcialmente essa inibição. A substituição do resíduo L54 por Q provocou uma redução na atividade de ligação ao DNA. Além disso, embora esta proteína mutada ainda ligue ATP, não foi capaz de hidrolisá-lo ou realizar troca de fitas de DNA, sugerindo que o resíduo L54 está envolvido nesses processos. Estes resultados sugerem que a proteína HsRecX modula a atividade de HsRecA através de interações HsRecA-HsRecX e possivelmente controla a disponibilidade de DNA substrato de RecA.



## ABSTRACT

DNA repair is crucial to the survival of all organisms from unicellular life forms to humans. The bacterial RecA protein is a central component in DNA repair as it induces indirectly the expression of proteins involved in non-mutagenic and mutagenic DNA repair, SOS repair and recombination repair. RecX is a modulator protein of RecA activity, but the mechanism of control remains unknown. The *recA* and *recX* genes of *Herbaspirillum seropedicae* constitute a single operon, and evidences suggest that RecX participates in SOS repair, probably modulating RecA activities. To determine the involvement of RecX in the regulation of RecA activities, RecA wild-type, RecA mutant L54Q or L54Q G73A and RecX proteins of *H. seropedicae* were overexpressed and purified either in native or His-tagged (His) form and characterized *in vitro*. The interaction between the RecA and RecX proteins of *H. seropedicae* (HsRecA and HsRecX) was demonstrated by sepharose bead immobilization and two dimensional electrophoresis. DNA band-shift assays revealed that both HsRecX and HsRecA proteins bound to single-stranded DNA (ssDNA) and also double-stranded DNA (dsDNA) in the absence of ATP. The HsRecX bound to DNA even in the presence of HsRecA. HsRecA also possessed ATP binding, ATP hydrolysis and DNA strand exchange activities. The HsRecX inhibited 90% of the HsRecA DNA strand exchange activity even when present in a 50 times less molar concentration than HsRecA. ATP binding to HsRecA was not affected by the addition of RecX, but the ATPase activity was reduced. Under conditions where HsRecX was present prior to the formation of RecA filaments (RecA-ssDNA), the inhibition was substantially reduced, and excess of ssDNA partially suppressed this inhibition. The substitution of the L54 residue by Q decreased HsRecA DNA binding activity. In addition, although the mutant protein still binds ATP, it was not able to hydrolyze it nor to exchange DNA strands, suggesting that the L54 residue is involved in these processes. The results suggest that the HsRecX protein modulates HsRecA activities by HsRecA-HsRecX interactions and probably controls the availability of the DNA substrate of RecA.

## 1 INTRODUÇÃO

O DNA genômico bacteriano, como qualquer macromolécula, está constantemente sujeito a lesões químicas e físicas. O reparo destas lesões é essencial já que o DNA é o molde para a sua própria duplicação e para a produção dos diversos tipos de RNAs e proteínas (Kuzminov, 1999).

Replicação incompleta implica em instabilidade genômica ou até mesmo letalidade para a célula. A interrupção da replicação decorrente de modificações químicas ou quebras no DNA pode produzir pelo menos três fatores: (1) indução de deleções ou rearranjos genômicos, quando a síntese de DNA reinicia em pontos errados; (2) indução de mutações, quando um nucleotídeo incorreto for adicionado ou (3) indução de letalidade, quando o bloqueio não for restaurado. Na tentativa de impedir alterações genéticas, ou, pelo menos, reduzir sua frequência, uma maquinaria enzimática complexa tem se desenvolvido (Friedberg *et al.*, 1995).

A proteína RecA é uma peça chave no processo de reparo do DNA em bactérias, pois ao induzir a autoclivagem do repressor LexA promove a expressão de proteínas envolvidas no reparo não mutagênico e mutagênico do DNA (para revisão Goodman, 2002) e ao catalisar a troca de fitas de DNA promove o reparo por recombinação (para revisão Lusetti & Cox, 2002). Mutações no gene *recA* são pleiotrópicas: os processos de recombinação homóloga, reparo, mutagênese e a divisão celular são afetados (Bianco *et al.*, 1998).

A proteína RecA está presente em todas as bactérias e proteínas homólogas à RecA têm sido identificadas em uma variedade de organismos, desde bacteriófagos até humanos (Roca & Cox, 1997). No bacteriófago T4, a proteína homóloga à RecA foi denominada UvsX, em eucariotos Rad51 e Dmc1 e em arqueobactéria RadA. RecA, UvsX, Rad51, Dmc1 e RadA compreendem uma família de proteínas com função e sequência universalmente conservadas (Bianco *et al.*, 1998; Lusetti & Cox, 2002). Essa alta similaridade indica que as funções da proteína RecA são essenciais em todas as formas de vida. Dentre as proteínas constituintes da família RecA, a proteína RecA bacteriana tem sido principalmente estudada, uma vez que as bactérias constituem o grupo de organismos mais simples e a alta conservação de RecA permite a extensão

das funções de RecA para as proteínas homólogas identificadas nos organismos superiores.

Para desempenhar suas funções, foi mostrado que a proteína RecA de *Escherichia coli* requer a participação de outras proteínas cuja síntese e/ou atividade são reguladas pela própria RecA (Bianco & Kowalczykowski, 1998). Em particular, a identificação de um grande número de proteínas moduladoras da atividade da proteína RecA (proteínas RecFOR, RecBCD, SSB, LexA, UmuD, DinI e RecX) enfatiza a importância biológica da regulação da função de RecA. Aparentemente a regulação de RecA se dá através de uma complicada rede de interações protéicas (Stohl *et al.*, 2003).

A proteína RecX despertou o interesse de diversos grupos de pesquisa porque o gene *recX* apresenta uma localização altamente conservada no genoma bacteriano: a jusante de *recA*, formando um único operon, e também porque uma grande variedade de fenótipos tem sido associada a mutantes *recX* (Zaitsec *et al.*, 1994; Guiliani *et al.*, 1997; Papavinasasundaram *et al.*, 1997; Vierling *et al.*, 2000; Yang & Chou, 2001; Yang *et al.*, 2002; Sukchawalit *et al.*, 2001; Galvão, 2001). Estudos *in vivo* e *in vitro* em diversos microrganismos indicaram a participação da proteína RecX na modulação das atividades de RecA, porém o mecanismo e a função desse processo permanecem alvo de estudo (Stohl *et al.*, 2002, 2003; Venkatesh, 2002; Drees *et al.*, 2004a, 2004b; Lusetti *et al.*, 2004b).

Os genes *recA* e *recX* da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* estão organizados em um único operon (Galvão, 2001). Análises fisiológicas do mutante *recX* de *H. seropedicae* sugeriram a participação da proteína RecX nos processos onde a proteína RecA é essencial como a resposta SOS e a recombinação homóloga (Galvão, 2001; Galvão *et al.*, 2003), indicando fortemente o envolvimento da proteína RecX na modulação da atividade de RecA. Com o intuito de elucidar esse processo, neste trabalho, as proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae* foram superexpressas, purificadas e caracterizadas *in vitro*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A interrupção da síntese de DNA ocorre quando a forquilha de replicação encontra barreiras no DNA de natureza espontânea ou causadas por agentes ambientais (Kuzminov, 1999; Lusetti & Cox, 2002; Courcelle & Hanawalt, 2003). As barreiras de natureza espontânea são formadas devido ao pareamento incorreto, a tautomerização, a metilação, a desaminação (converte citosina em uracila, por ex.), a depurinização e a depirimidinização (promovem a formação de sítios abásicos) e a oxidação de bases (espécies reativas de oxigênio resultantes desse processo promovem a fragmentação de riboses, perda ou modificação de bases) (Friedberg *et al.*, 1995). As barreiras causadas por agentes ambientais compreendem os fotoprodutos da exposição a luz UV (dímeros de pirimidina, por ex.); a ligação covalente entre as fitas da dupla-hélice do DNA causada pela exposição do DNA a psoralenos e luz UV ou mitomicina C, simples e duplas quebras no DNA resultantes da radiação ionizante (raios X ou raios gama) (Kuzminov, 1999). A recuperação destes sítios de lesão com características particulares requer enzimas e mecanismos de reparo particulares.

O reparo do DNA consiste de um conjunto de reações que promove a restauração da síntese do DNA. No reparo não mutagênico, a restauração da replicação ocorre sem comprometer a integridade do genoma, já no reparo mutagênico, modificações na sequência de bases são inseridas.

O reparo não mutagênico inclui o reparo por reversão direta, reparo por excisão de bases, nucleotídeos e pareamentos incorretos (*mismatches*) e, finalmente, o reparo por recombinação homóloga. O reparo por reversão direta e o reparo por simples excisão e reinserção do nucleotídeo correto ocorrem diante de lesões que afetam apenas uma das fitas do DNA. Já o reparo por recombinação homóloga ocorre na presença de lesões e quebras em uma única fita de DNA ou em ambas as fitas de DNA (Cox, 2001; Lusetti & Cox, 2002; Courcelle & Hanawalt, 2003).

O reparo mutagênico, acionado apenas em situações de alta concentração de lesões e/ou quebras nas fitas de DNA na estirpe de *E. coli* selvagem, inclui a mutagênese SOS (Goodman, 2002) e a mutagênese modulada por UV (Pajewala *et al.*, 1994).

O mecanismo de reparo por reversão direta é catalisado pelas fotoliasas no reparo de dímeros de pirimidina (Sancar, 1994a) e pela proteína suicida Ada no reparo de bases *O*<sup>6</sup>-metilguanina (Shevell *et al.*, 1990).

Em todos os tipos de reparo por excisão, é feita a remoção do segmento de DNA que contém a lesão e a outra fita intacta é usada como molde. No reparo por excisão de bases, DNA glicosidases removem a base modificada produzindo um sítio abásico e endonucleases AP clivam a fita que contém o sítio abásico e removem alguns nucleotídeos formando uma lacuna no segmento de DNA. A DNA polimerase I (polI) catalisa a adição dos nucleotídeos requeridos, preenchendo esta lacuna, e a DNA ligase une os nucleotídeos (de Vries & Wackernagel, 1992). Esse mecanismo é adotado para o reparo de lesões oxidativas e metilações.

O reparo por excisão de nucleotídeos está envolvido no reparo de lesões que causam distorções no DNA. A excinuclease remove um segmento de 12 a 13 nucleotídeos contendo a lesão, resultando em uma lacuna. Após a síntese da sequência de nucleotídeos correta pela polI, a DNA ligase une a fita de DNA originalmente lesada (Sancar, 1994b). Em *E. coli*, a detecção e o reparo por excisão de nucleotídeos do DNA contendo lesões causadas por UV, mitomicina, mostarda nitrogenada, psoralenos fotoativados, N-metil- N'-nitro-N-nitrosoguanidina, são feitos pelo complexo UvrABC em presença de ATP (Orren & Sancar, 1989).

O reparo de pareamentos incorretos pode levar à excisão de mais de 1000 nucleotídeos de uma das fitas do dsDNA na tentativa de reparar um pareamento incorreto criado durante a replicação (Modrich, 1994).

O reparo por recombinação homóloga promove a restauração da síntese de DNA através da troca de fitas homólogas de DNA. Quando apenas uma das fitas de DNA encontra-se lesada ou quebrada, a troca de fitas de DNA ocorre com o par homólogo. Por outro lado, para reparar lesões que envolvem as duas fitas de DNA (ligações entre fitas de DNA, por exemplo) e reparar duplas quebras no DNA sem perder a informação da sequência, é necessária a presença de uma molécula de DNA homóloga extra. Esse fragmento de DNA extra pode ser proveniente da conjugação,

transformação ou transdução (Roca & Cox, 1997; Kuzminov, 1999), ou da própria replicação.

Para o reparo propenso a erro do DNA através da mutagenese SOS não é necessária a presença de uma fita de DNA complementar intacta ou de qualquer DNA extra, contrastando com o mecanismo de reparo não-mutagênico (Goodman, 2002).

## **2.1 Envolvimento da Proteína RecA nos processos de Recombinação Homóloga, Resposta SOS e Mutagenese SOS**

A proteína RecA de *E. coli* é uma proteína multifuncional essencial em três processos biológicos distintos porém relacionados: (1) recombinação homóloga; (2) resposta SOS, regulando a expressão coordenada dos genes presentes no regulon SOS; (3) mutagenese SOS, mediando a síntese translesão (Bianco & Kowalczykowski, 2001). Essa multifuncionalidade de RecA torna mutações no gene *recA* pleiotrópicas (Bianco *et al.*, 1998).

### **2.1.1 Recombinação Homóloga**

A recombinação homóloga foi descrita em *E. coli* nos anos 40 (Lederberg, 1947) e por muitos anos pensou-se ser o resultado de um processo sexual, análogo ao que é encontrado em eucariotos. Posteriormente, foi constatada uma maior sensibilidade a lesões no DNA do mutante deficiente em recombinação indicando que a recombinação em bactérias é também um mecanismo de reparo (Clark *et al.*, 1966; Clark & Margulies, 1965; Howard-Flanders, 1973; Howard-Flanders & Theriot, 1966). Recentemente, foi estabelecido que o reparo da forquilha de replicação interrompida é a primeira função do sistema de recombinação bacteriano (Cox *et al.*, 2001). As vias de reparo por recombinação são variadas e numerosas, dada à multiplicidade de graus e tipos de lesões que podem estar causando a interrupção da replicação e dada à importância do reparo não mutagênico. O reparo por recombinação

é dependente de proteínas envolvidas em diferentes processos do metabolismo de DNA e apresentam funções enzimáticas especializadas e complexas.

#### 2.1.1.1 Vias de Reparo por Recombinação

As vias de reparo de quebras em ambas as fitas do DNA (duplas quebras) e as vias de reparo de lesões nas fitas líder e atrasada do DNA estão agrupadas e ilustradas nas figuras 2.1 e 2.2, respectivamente.

O mecanismo de reparo de duplas quebras na forquilha de replicação (*double-strand break*, DSB) mostra claramente a integração entre os processos de replicação e recombinação (Lovett, 2003), já que há a participação da RecA e do complexo RecBCD, proteínas envolvidas na recombinação, e a participação da PriA, PriB, PriC, DnaC, DnaT, DnaB e DnaG, proteínas envolvidas na replicação do DNA genômico bacteriano (Kuzminov, 1999).

A dupla quebra da forquilha de replicação (DSB) é resultante da colisão da DNA polimerase III (polIII) com uma das fitas de DNA quebrada ou resultante da ação de nucleases que quebram ativamente a forquilha estacionada (Figura 2.1A). Em *E. coli*, este tipo de quebra é processada pelo complexo nuclease/helicase RecBCD (detalhes na seção 2.5.3), o qual promove a formação de extensões de DNA simples-fita (ssDNA) 3'. A proteína RecA adquire a sua forma ativa ao ligar-se ao ssDNA gerado na presença de ATP, formando uma estrutura denominada de filamento de RecA (Figura 2.3). O filamento de RecA, ao identificar o DNA dupla-fita (dsDNA) homólogo, invade-o a partir do seu terminal 3', criando intermediários de recombinação denominados de alça-D (detalhes na seção 2.2.2).

Xu & Marians (2003) mostraram que, na ausência da proteína PriA, a síntese do DNA a partir do terminal 3' invasor é estendida sem haver a formação de uma forquilha de replicação, produzindo ssDNA extensos (Figura 2.1A). Por outro lado, a ligação da proteína PriA ao terminal 3' invasor inibe a síntese do DNA pela polIII e promove juntamente com PriBC DnaCT o direcionamento da helicase DnaB para a fita deslocada da alça-D. DnaB, por sua vez, recruta a primase DnaG e induz a síntese de



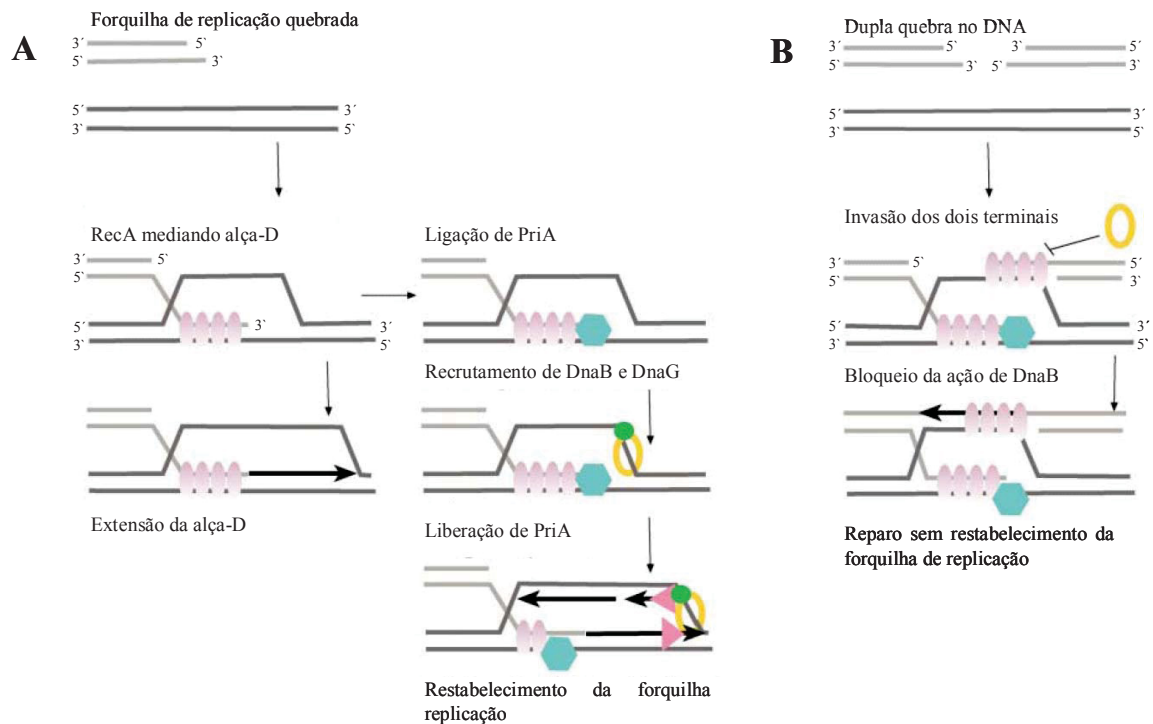
ambas as fitas de DNA pela polIII. A partir desse modelo é possível verificar que a proteína PriA assegura que a recombinação em alça-D seja resolvida numa completa forquilha de replicação, com capacidade de replicar todo o genoma. A estrutura ramificada (em forma de cruz) gerada como produto desse processo, denominada junção de Holliday, é processada pelo complexo RuvABC. O papel da proteínas RecF, RecOR no reparo de dupla quebra da forquilha permanece obscuro (Lovett, 2003).

No reparo de duplas quebras no DNA formadas de forma independente da replicação, os dois terminais simples-fita 3' disponíveis formam duas alças-D (Figura 2.1B). Essa estrutura aparentemente impede a ligação da proteína DnaB e conseqüentemente a sua ausência inibe a formação da forquilha de replicação mediada por PriA. Dessa forma, o reparo é efetuado apenas com a síntese de uma curta seqüência de DNA, sem a restauração da forquilha de replicação. Neste tipo de reparo, há a necessidade da presença de DNA extra (Lovett, 2003).

A colisão da DNA polimerase III com lesões no DNA pode levar à formação de uma lacuna em uma das fitas de DNA, como ilustrado no esquema da figura 2.2. Sugere-se que o reparo desse tipo de lesão ocorra a partir da regressão da forquilha de replicação. Essa regressão pode ocorrer espontaneamente (Cordeiro-Stone *et al.*, 1999) e também pode ser promovida enzimaticamente pelas proteínas RecG (McGlynn & Lloyd, 2000; 2001), RuvAB (Michel *et al.*, 2001) ou RecA (Robu *et al.*, 2001). A atividade de RecA neste processo parece ser inteiramente dependente da hidrólise de ATP (Robu *et al.*, 2001, 2004) e representa uma possível aplicação da função motora de RecA (descrita em detalhes na seção 2.2.3.1; Lusetti & Cox, 2002; Cox *et al.*, 2005). Estudos *in vivo* reportados recentemente mostraram que a regressão da forquilha de replicação promovida por RecG e RuvAB não é essencial para o reinício da replicação (Donaldson *et al.*, 2004).



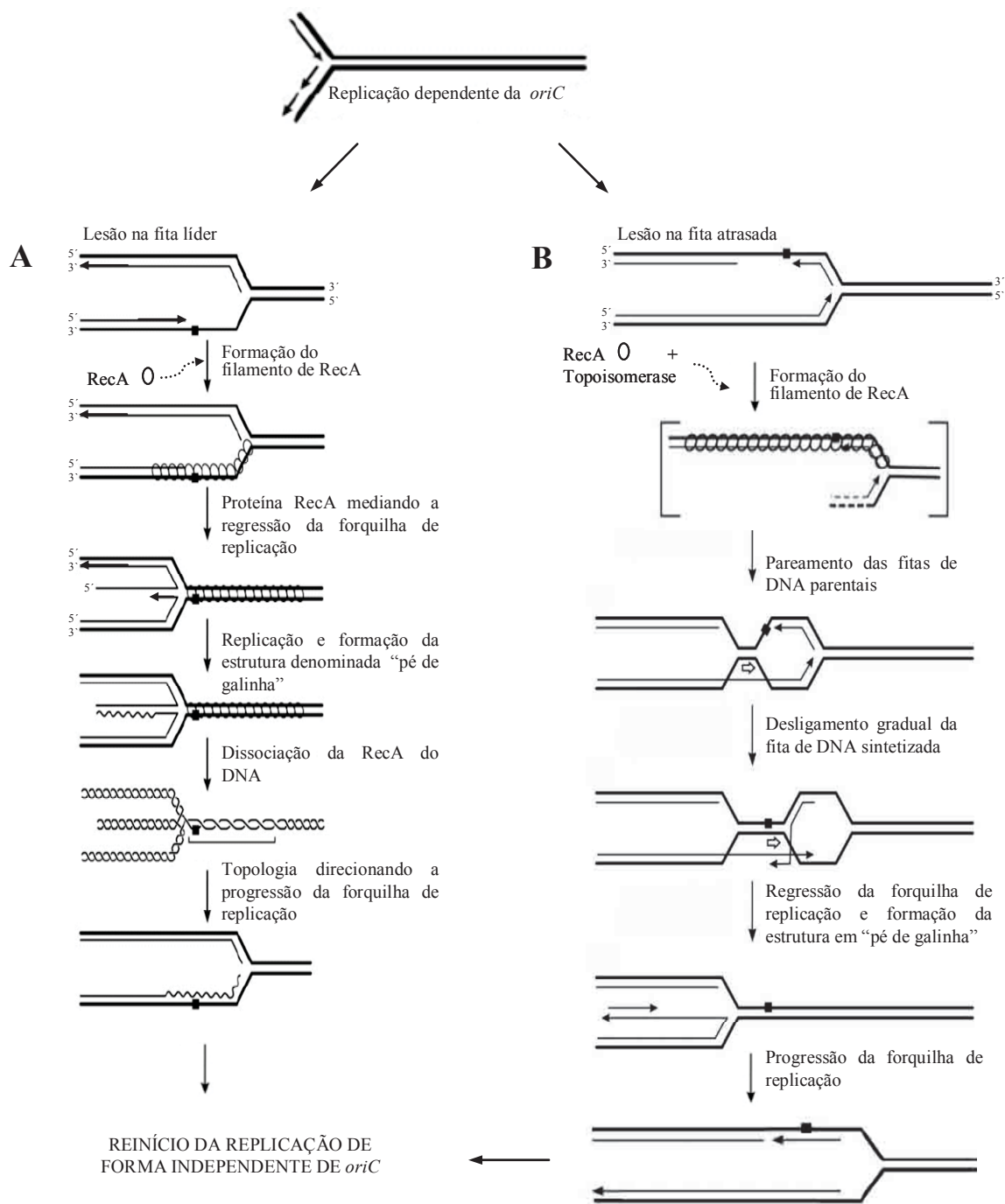
**FIGURA 2.1 - VIAS DE REPARO POR RECOMBINAÇÃO ENVOLVIDAS NA RESTAURAÇÃO DA FORQUILHA DE REPLICAÇÃO DIANTE DE DUPLA QUEBRA DA FORQUILHA DE REPLICAÇÃO (DSB) OU DUPLA QUEBRA DO DNA GENÔMICO.**



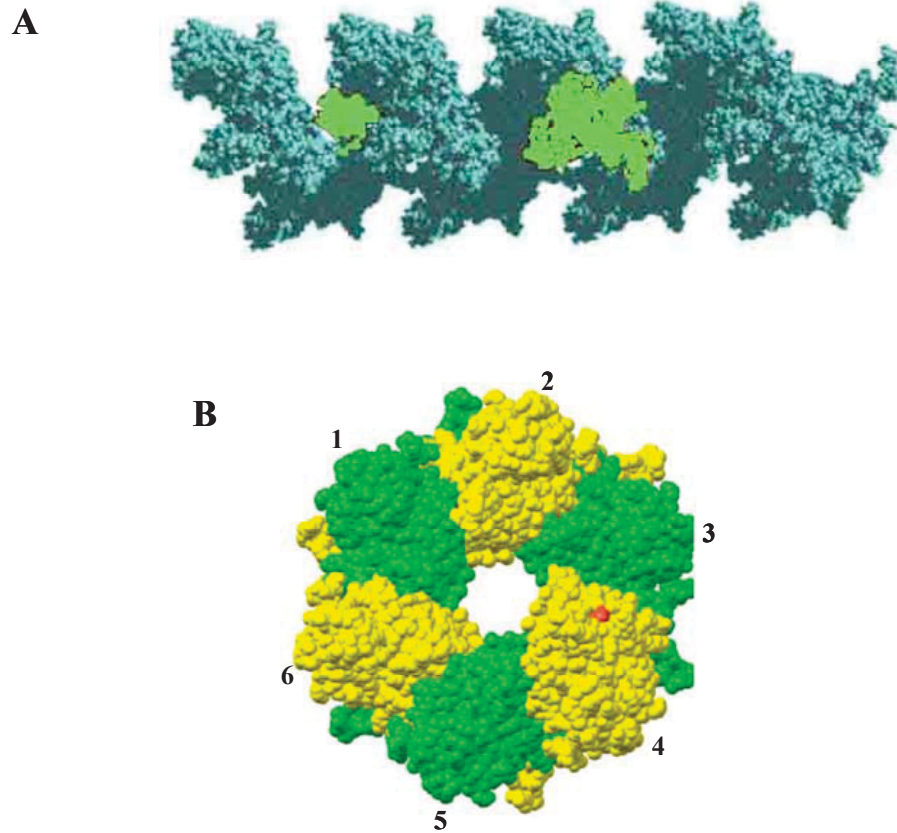
Etapas do reparo de dupla-quebra na forquilha de replicação (A) e de dupla quebra do DNA genômico (B). Legenda: RecA - círculo rosa, PriA - hexágono azul, DnaB helicase - anel amarelo, Dna G - círculo verde e DNA polimerase III - triângulo rosa. A descrição detalhada de cada via de reparo encontra-se no texto (seção 2.1.1.1).

FONTE: Adaptado de Lovett (2003).

**FIGURA 2.2 - VIAS DE REPARO POR RECOMBINAÇÃO ENVOLVIDAS NA RESTAURAÇÃO DA FORQUILHA DE REPLICAÇÃO DIANTE DE LESÕES OU OUTRAS BARREIRAS.**



A via de reparo varia de acordo com a localização da lesão. A lesão pode ser encontrada na fita líder (A) ou na fita atrasada (B). A descrição detalhada de cada via de reparo encontra-se no texto. Legenda: Lesão ou barreira no DNA - quadrado preto e RecA - círculos abertos.  
 FONTE: Adaptado de Lusetti & Cox, 2002.

**FIGURA 2.3 - ESTRUTURA DO FILAMENTO DE RecA.**

(A) Um filamento de RecA contendo 24 monômeros, baseado na estrutura de RecA descrita por Story & Steitz, 1992, com dois monômeros destacados. (B) Secção transversal do filamento de RecA mostrando os 6 monômeros envolvidos na formação de uma volta do polímero. Cada monômero está representado alternadamente em amarelo e verde. Em vermelho está sendo mostrado o sítio de ligação para o ATP no filamento ativo.

FONTE: Adaptado de Cox (2003) e VanLook *et al.* (2003a).

Diante de uma região lacuna na fita líder, RecA se liga à região de ssDNA na direção 5'→3', levando a regressão da forquilha até o ponto da lesão. Como consequência deste processo é formada uma junção de Holliday com braços curtos denominada “pé de galinha” (*chicken foot*) (Figura 2.2A). A formação desta estrutura permite que a DNA polimerase II (polIII) copie a sequência de DNA correta a partir da fita molde sintetizada (Goodman, 2002). Após o reanelamento das fitas moldes, RecA se desprende do DNA deixando as fitas moldes parcialmente desenroladas. Este desenrolamento pode prover à molécula de DNA o stress torcional necessário para impulsionar a forquilha numa direção progressiva e restaurar a estrutura da forquilha (Lusetti & Cox, 2002).

Diante de uma lacuna na fita atrasada, o mecanismo de reparo apresenta características particulares uma vez que a ligação dos monômeros de RecA ao DNA e o pareamento das fitas homólogas de DNA sempre ocorre na direção 5'→3'. O modelo proposto na figura 2.2B foi testado *in vitro* e se mostrou dependente da presença de RecA e topoisomerase (Cunningham *et al.*, 1981). A troca de fitas cria uma bolha a jusante da forquilha, e tanto a bolha quanto a forquilha migram progressivamente até a região além da lesão, induzindo o desprendimento gradual da fita sintetizada. Quando essa é totalmente separada, as fitas sintetizadas formam a ramificação curta do “pé de galinha” e a bolha é desfeita como consequência do reanelamento das fitas originais. Sugere-se que o produto final desse processo de reparo seja o mesmo daquele já descrito para o reparo da lacuna na fita atrasada. Alternativamente, foi proposto que após sua formação a estrutura em “pé de galinha” poderia ser clivada, direcionando o reparo para o mecanismo de reparo de duplas quebras na forquilha de replicação, descrito anteriormente (Figura 2.1A; Cox, 2001; Lusetti & Cox, 2002). Tanto no reparo por recombinação das lacunas presentes na fita líder como na fita atrasada, a substituição da proteína ligadora de ssDNA (SSB) por RecA na região de DNA simples-fita é mediada pelo complexo RecFOR (Umezumi & Kolodner, 1994; Webb *et al.*, 1997; Shan *et al.*, 1997).

Courcelle & Hanawalt (2003) também descrevem a participação de RecA na recuperação da forquilha de replicação quando a replicação é reiniciada a jusante do sítio lesado. O modelo proposto por estes autores é classificado como processo de tolerância à lesão, uma vez que a maquinaria de reparo por recombinação apenas

preenche as lacunas formadas e a lesão, então, é reparada através de outros mecanismos de reparo, como, por exemplo, o reparo por excisão de nucleotídeo, mediado por UvrABC. Esses mesmos autores propõem que a proteína RecA não é requerida para a troca de fitas de DNA numa situação de parada da replicação, mas sim para a manutenção da integridade da estrutura até que a lesão seja removida através de outros mecanismos de reparo.

### 2.1.2 Resposta SOS

A Resposta SOS é um complexo mecanismo celular induzido devido à interrupção da replicação diante de barreiras no DNA (Radman, 1975). A indução da resposta SOS promove a expressão de mais de 40 genes presentes no regulon SOS (Courcelle *et al.*, 2001). Esses genes operam na manutenção da integridade da forquilha de replicação, no reparo de lesões, na síntese translesão, e no bloqueio da divisão celular prematura até que as barreiras no DNA tenham sido eliminadas (Crowley & Courcelle, 2002; Friedberg *et al.*, 1995).

Assim como no reparo por recombinação, a proteína RecA também tem um papel central na resposta SOS. Ao ligar-se ao ssDNA formado devido à interrupção da replicação, RecA na presença de ATP torna-se capaz de induzir a expressão dos genes presentes no regulon SOS (Courcelle *et al.*, 2001).

Em condições normais de crescimento, a expressão dos genes SOS é reprimida pelo repressor LexA, que, na sua forma dimérica, liga-se a uma sequência palindrômica presente na região operadora dos genes SOS impedindo sua transcrição (Brent & Ptashne, 1981; Little *et al.*, 1981; Walker, 1984). A sequência consenso do operador SOS é 5' TACTGTATATATATACAGTA3', e os nucleotídeos em negrito são absolutamente conservados (Lewis *et al.*, 1994). A expressão basal de genes SOS em condição de não indução é mantida pela sequência imperfeita do sítio operador ou devido a promotores alternativos (Kuzminov, 1999). A desrepressão dos genes constituintes do regulon SOS ocorre quando a proteína RecA ligada ao ssDNA e em presença de ATP ativa a autoclivagem (coproteólise) do repressor LexA tornando-o

inativo (Brent & Ptashne, 1980; Little *et al.*, 1981; Little & Mount, 1982). A recuperação da capacidade de síntese de DNA em resposta ao reparo das lesões se reflete na redução da quantidade de ssDNA disponível. RecA na ausência de ssDNA não é capaz de induzir a co-proteólise de LexA, que se acumula na forma ativa, reprimindo novamente a expressão dos genes SOS (revisado por Kuzminov, 1999).

Muitos dos genes regulados positivamente na resposta SOS tem como função o reparo das lesões no DNA e a restauração do processo de replicação. Incluem-se neste grupo os produtos dos genes *uvrA*, *uvrB* (Kenyon & Walker, 1980) e *ydjQ* (denominado agora *cho*) (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000; Moolenaar *et al.*, 2002), os quais participam do reparo por excisão de nucleotídeos. Outros genes regulados positivamente são *polB*, *dinB*, *umuCD* que codificam para as DNA polimerases: polII, polIV e polV, respectivamente.

As proteínas envolvidas no reparo mutagênico (Mutagênese SOS, detalhada na seção 2.1.3) são expressas a partir do regulon SOS (Kuzminov, 1999). Nos primeiros 5 minutos após a irradiação com luz UV, os genes *recA* e *recN* (envolvidos no reparo do DNA por recombinação) e o gene *sulA* (envolvido na inibição da divisão celular) são induzidos. O repressor LexA também é induzido nesse período. O grau de expressão destes genes após a indução é 2 - 30 vezes maior do que a expressão constitutiva (Courcelle *et al.*, 2001). Os genes *umuD* e *umuC* são fortemente expressos 20 minutos após a exposição à luz UV, indicando que numa situação de graves lesões no DNA, ou seja, numa situação em que a síntese normal do DNA não tenha sido restaurada através do reparo não mutagênico, as proteínas envolvidas no reparo mutagênico, UmuD e UmuC, são necessárias (Courcelle *et al.*, 2001).

### 2.1.3 Mutagênese SOS

A mutagênese SOS, também conhecida como Reparo Propenso a Erro ou como Síntese Translesão, é um processo de reparo que induz a inserção de mutações na sequência do DNA (Radman, 1975; Witkin, 1976). A proteína RecA, mais uma vez, está diretamente envolvida neste processo induzindo a co-proteólise da proteína UmuD

(Burckhardt *et al.*, 1988; Nohmi *et al.*, 1988; Shinagawa *et al.*, 1988) e participando da síntese translesão (Schlancher *et al.*, 2005).

Uma vez formada a proteína UmuD', a partir da indução da co-proteólise da proteína UmuD, UmuD' interage com UmuC formando o complexo estável UmuD'<sub>2</sub> + UmuC (UmuD'<sub>2</sub>C) também chamado de DNA polimerase V (polV; Shen *et al.*, 2003). Além da polV, *E. coli* apresenta outras 2 DNA polimerases: polII (Bonner *et al.*, 1988, 1990; Iwasaki *et al.*, 1990) e polIV (Wagner *et al.*, 1999), as quais realizam a replicação propensa a erro do DNA e apresentam a expressão controlada pela resposta SOS (Goodman, 2002). As duas principais DNA polimerases de *E. coli*, polII e polIII, não apresentam sua expressão controlada pela resposta SOS. A principal função de polII é remover os oligonucleotídeos de RNA enquanto processa os fragmentos de Okazaki e preencher as pequenas lacunas formadas durante o reparo de DNA por excisão de bases ou nucleotídeos (Kornberg & Baker, 1992). A polIII é responsável pela replicação genômica (Kornberg & Baker, 1992).

Diferentemente de polIII, polV catalisa a síntese de DNA introduzindo nucleotídeos em oposição à lesão (Fujii *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2000). Esse processo induz o aparecimento de mutações no DNA sintetizado numa alta frequência de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-4</sup> (Tang *et al.*, 2000). A polV é capaz de catalisar a síntese translesão tanto *in vivo* (Becherel *et al.*, 2002; Echols & Goodman, 1990; Goodman, 2000; Lenne-Samuel *et al.*, 2002) quanto *in vitro* (Reuven *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1998, 2000) em um processo que requer RecA, a subunidade β da DNA polimerase III e a proteína SSB. Apesar de aumentarem a eficiência da síntese translesão, a subunidade β (Pham *et al.*, 2002) e SSB (Fujii *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2002) não são essenciais, mas polV é totalmente dependente de RecA e ATP (Fujii *et al.*, 2004).

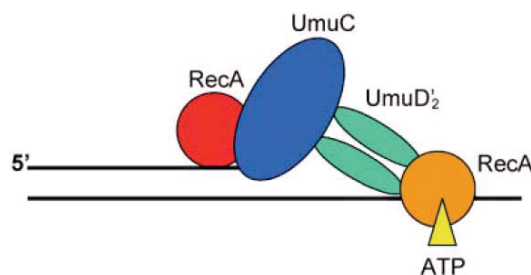
Em analogia ao termo replissomo, usado em referência às proteínas associadas à forquilha de replicação, o termo mutassomo passou a ser usado em referência às proteínas presentes próximas à região de lesão do DNA. Em situações de indução da mutagênese SOS *in vivo*, polV (UmuD'<sub>2</sub>C), RecA, SSB e a subunidade β da polIII, foram definidas por Goodman (2000) como as proteínas integrantes do mutassomo (Echols, 1982). Recentemente, Schlancher *et al.* (2005) definiram a composição do



mais simples complexo capaz de realizar a síntese translesão, denominado de mini-mutassomo, o qual é constituído pela polV e dois monômeros de RecA (Figura 2.4). Os componentes desse complexo foram determinados a partir de ensaios de interação proteína-proteína. Como a proteína UmuD'<sub>2</sub>C interage diretamente com RecA, sem o envolvimento do filamento de RecA (estrutura essencial no reparo por recombinação e na resposta SOS), a hipótese levantada pelos autores é a de que a proteína RecA, na mutagênese SOS, não só direciona a polV para a forquilha de replicação interrompida, mas também participa como uma subunidade integrante da holoenzima ativa polV (Schlacher *et al.*, 2005). Essas evidências introduziram novas discussões envolvendo a atividade e o mecanismo de ativação de RecA, e também modificaram o modelo da síntese translesão (Schlacher *et al.*, 2005; Sweasy, 2005).

O modelo atual proposto por Sweasy (2005) para explicar o processo de síntese translesão em *E. coli* está descrito a seguir. Na presença de uma lesão no DNA, a forquilha de replicação é interrompida gerando uma região de ssDNA na qual a proteína RecA se liga. A proteína RecA, na forma de filamento de RecA e na presença de ATP induz a autoclivagem de UmuD, formando UmuD'. A interação prolongada do filamento de RecA com UmuD' parece induzir a deformação desse filamento e estimular a substituição de RecA por SSB na ligação ao ssDNA. A destruição do filamento de RecA pela ligação de SSB restringe a mutagênese SOS como o único processo de reparo da mutação, uma vez que a recombinação homóloga só ocorre na presença de RecA na forma de filamento de RecA. O monômero de RecA que permaneceu ligado ao ssDNA após a destruição do filamento, na presença do ATP e das 2 subunidades de UmuD', recruta a proteína UmuC (ligada a outro monômero de RecA) formando o mini-mutassomo, complexo catalisador da síntese translesão.



**FIGURA 2.4 - MODELO DO MINI-MUTASSOMO.**

RecA interage com UmuC e RecA-ATP com UmuD', sugerindo que duas moléculas de RecA façam parte da polV. Essas duas interações são necessárias para a síntese de DNA translesão, um processo que não requer a presença do filamento de RecA, nem a subunidade  $\beta$  da DNA polimerase ou a proteína SSB.

FONTE: Schlacher *et al.*, 2005.

## 2.2 Atividades da proteína RecA

Para mediar este amplo espectro de eventos biológicos (recombinação homóloga, resposta SOS e mutagenese SOS) a proteína RecA apresenta as seguintes atividades bioquímicas: (1) ligação ao DNA, (2) troca de fitas homólogas de DNA, (3) hidrólise de ATP e (4) indução da autoclivagem (processamento coproteolítico) de proteínas efetoras.

### 2.2.1 Ligação ao DNA

A capacidade de ligar-se ao DNA é fundamental para o envolvimento da proteína RecA no metabolismo de DNA. Esse evento envolve duas etapas: nucleação e extensão. A nucleação é o processo mais lento, apesar de ocorrer de forma mais eficiente na presença de ssDNA do que na presença de dsDNA (Pugh & Cox, 1987; 1988). Esse processo inicia-se com a ligação do protômero da proteína RecA ao DNA. A unidade de ligação da proteína RecA de *E. coli* ao DNA ainda não foi definida, mas em *Thermus thermophilus* essa foi definida como monomérica (Masui *et al.*, 1998). A nucleação é um evento dependente de pH que ocorre mais rapidamente se o pH for reduzido de 7,0 para 6,0 (Pugh & Cox, 1987; Weinstock *et al.*, 1981; Arenson *et al.*, 1999). Em qualquer pH, a partir do terminal de associação, protômeros adicionais

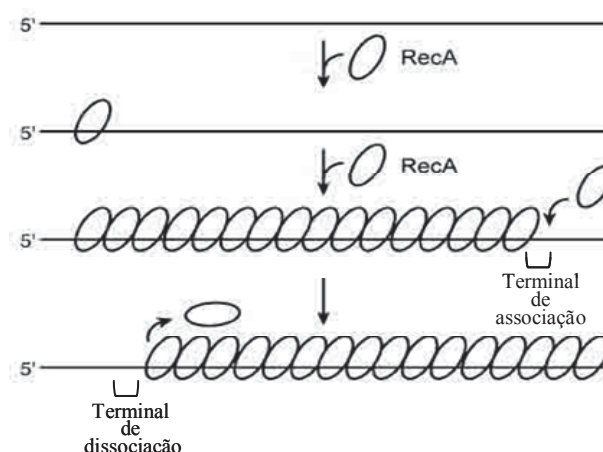
ligam-se ao ssDNA de forma rápida, unidirecional ( $5' \rightarrow 3'$ ) (Pugh & Cox, 1988; Shan *et al.*, 1997) e cooperativa (Figura 2.5), gerando o filamento de RecA (Kowalczykowski & Eggleston, 1994; Menetski & Kowalczykowski, 1985). Esse filamento é formado por moléculas de RecA ligadas ao redor do DNA numa estrutura helicoidal regular (Figura 2.3; Egelman & Stasiak, 1988, 1993). A associação de RecA ao dsDNA também é efetuada na direção  $5' \rightarrow 3'$ , mas pode ser direcionada por qualquer uma das fitas de DNA (Pugh & Cox, 1987; 1988). A introdução de um terminal simples-fita  $5'$  no dsDNA restringe a direção desses processos e a introdução de um terminal  $3'$  simples-fita impede a sua ocorrência (Lindsley & Cox, 1989).

O processo de dissociação ocorre a partir da extremidade oposta ao terminal de associação e na direção  $5' \rightarrow 3'$  em filamentos formados tanto no ssDNA (Shan *et al.*, 1997) quanto no dsDNA (Lindsley & Cox, 1990). A dissociação é um evento altamente dependente de pH, que ocorre lentamente em pH6,0 e atinge níveis máximos em pH7,5 (Lindsley & Cox, 1989; Arenson *et al.*, 1999).

A proteína SSB substitui RecA após a sua dissociação. Como consequência, na presença de SSB, a nucleação da proteína RecA no ssDNA é reduzida consideravelmente (Madiraju *et al.*, 1992; Shan *et al.*, 1997). Esta inibição é suprimida *in vivo* por outras proteínas. As proteínas RecO e RecR formam um complexo que facilita a nucleação de RecA no ssDNA ligado a SSB (Umezumi & Kolodner, 1994). Além disso, o complexo RecBCD prepara o DNA duplex para a ligação de RecA, gerando um terminal simples-fita  $3'$ , alvo de nucleação. RecBCD também direciona a RecA ao substrato previamente preparado (Anderson & Kowalczykowski, 1997b; Churchill *et al.*, 1999). *In vitro*, a inibição de SSB é suprimida ao adicioná-la ao sistema de recombinação após a incubação prévia de RecA com ssDNA.

A hidrólise de ATP não é necessária para a associação dos monômeros de RecA no ssDNA, mas o é para sua dissociação (Shan *et al.*, 1997; Arenson *et al.*, 1999; Bork *et al.*, 2001; Lindsley & Cox, 1989, 1990; Weinstock *et al.*, 1981; Shivashankar *et al.*, 1999).

FIGURA 2.5 - ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO DO FILAMENTO DE RecA NO ssDNA.



A etapa limitante da formação do filamento de RecA, a nucleação, ocorre seguida de extensão rápida na direção 5'→3'. A dissociação ocorre também unicamente nessa direção, procedendo a partir do terminal oposto ao terminal onde está ocorrendo a extensão. A dissociação dos monômeros de RecA do terminal de dissociação requer hidrólise de ATP.

FONTE: Drees *et al.*, 2004a.

A velocidade de dissociação máxima do ssDNA linear é de 60-70 monômeros por minuto (Arenson *et al.*, 1999) e no dsDNA essa é aproximadamente 2 vezes maior (120 monômeros por minuto; Cox *et al.*, 2005).

No início da formação dos filamentos de RecA em moléculas de dsDNA e ssDNA lineares, a proteína RecA apresenta velocidades máximas de hidrólise de ATP: 20 e 30  $\mu\text{mol/L}$  por minuto, respectivamente. Entretanto, a velocidade vai sendo reduzida gradualmente atingindo no estado estacionário valores de 4,2  $\mu\text{mol/L}$  por minuto e 1,23  $\mu\text{mol/L}$  por minuto no filamento de ssDNA linear (Shan *et al.*, 1997) e dsDNA linear (Cox *et al.*, 2005), respectivamente. O estado estacionário reflete o balanço final entre a dissociação e a associação de monômeros de RecA ao DNA. A redução da velocidade de hidrólise de ATP (30 para 4,2  $\mu\text{mol/L}$  por minuto no ssDNA linear e 20 para 1,23  $\mu\text{mol/L}$  por minuto no dsDNA linear) indica que houve uma redução do número de moléculas de RecA ligadas no DNA de 6 a 15%, devido à ocupação parcial do DNA pela proteína RecA (Shan *et al.*, 1997; Cox *et al.*, 2005).

Nos filamentos de RecA formados no ssDNA circular o balanço entre a dissociação e a associação de RecA mantém o ssDNA totalmente preenchido e

conseqüentemente a velocidade de hidrólise de ATP mantém-se sempre constante e máxima, 30  $\mu\text{mol/L}$  por minuto (Shan & Cox, 1996; Shan *et al.*, 1997). Mesmo quando há regiões do DNA não ocupadas por RecA, essas regiões são rapidamente preenchidas pela extensão do filamento de RecA, não afetando a velocidade de hidrólise. A manutenção da velocidade de hidrólise de ATP, característica exclusiva do filamento de RecA formado no ssDNA circular, permite verificar a influência de outras proteínas sobre a atividade de hidrólise de ATP de RecA (Drees *et al.*, 2004a).

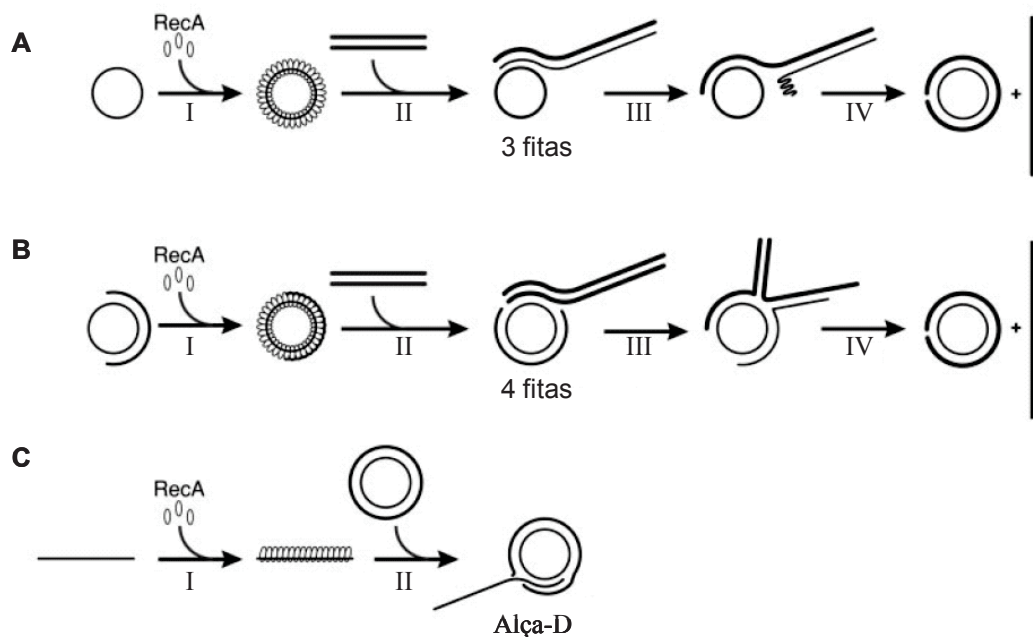
### 2.2.2 Troca de fitas homólogas de DNA

A recombinação homóloga pode ser estudada *in vitro* através de três reações de troca de fitas de DNA catalisadas por RecA (Figura 2.6). Na primeira reação, a qual envolve 3 fitas de DNA, o filamento de RecA está ligado ao ssDNA circular e a troca de fitas ocorre com o dsDNA linear homólogo. Os substratos e os produtos dessa reação são facilmente distinguidos em gel de agarose ou através de microscopia eletrônica. Na segunda reação, a qual envolve 4 fitas de DNA, o filamento de RecA é formado a partir de uma lacuna no dsDNA circular e a troca de fitas ocorre com um dsDNA linear homólogo (Cox, 2003). Na terceira reação de pareamento, denominada de alça-D, RecA se liga ao ssDNA linear e promove o pareamento de parte do segmento de ssDNA com o dsDNA circular através da invasão do terminal 3' do ssDNA. Essa reação é essencial no reparo de dupla quebra no DNA, já que o terminal 3' simples-fita invasor pode ser subseqüentemente usado como oligonucleotídeo iniciador na replicação (Figura 2.1; Churchill *et al.*, 1999; Xu & Mariani, 2002; Lovett, 2003).

Nas três reações, a proteína RecA liga-se aos substratos de forma ordenada, primeiro ao ssDNA, (ou ao substrato que apresenta a região simples-fita, na reação que envolve 4 fitas de DNA) e em seguida ao dsDNA. Como ilustrado na figura 2.6, na fase I, o filamento de RecA é formado através da nucleação e posterior extensão do filamento de RecA. Na fase II ocorre o alinhamento das regiões homólogas. O dsDNA homólogo é alinhado com o filamento de RecA previamente formado, gerando um

segmento pareado de aproximadamente 1 kpb (Roca & Cox, 1997; Lusetti & Cox, 2002). Na reação envolvendo 4 fitas o pareamento é feito na região da lacuna do DNA. Na fase III ocorre a formação e a extensão do DNA heteroduplex. Apenas a ligação do ATP, e não a sua hidrólise, é necessária para a realização das fases I, II e III, na reação de troca envolvendo 3 fitas de DNA (Shan *et al.*, 1996; Kowalczykowski & Krupp, 1995; Menetski *et al.*, 1990; Rehrauer & Kowalczykowski, 1993). Já a reação de troca envolvendo 4 fitas de DNA só ocorre com a hidrólise de ATP (Kim *et al.*, 1992). A extensão do DNA heteroduplex procede na direção  $5' \rightarrow 3'$  relativo ao ssDNA circular ou à região da lacuna até a formação dos produtos. Para a efetivação da fase IV, a hidrólise de ATP é necessária (Jain *et al.*, 1994).

**FIGURA 2.6 - REAÇÃO DE TROCA DE FITAS PROMOVIDA PELA PROTEÍNA RecA *in vitro*.**



(A) Reação de troca de 3 fitas entre ssDNA circular e dsDNA linear. O filamento de RecA é formado sobre o ssDNA. O complexo RecA-ssDNA permanece normalmente intacto durante toda a reação. (B) Reação de troca de 4 fitas entre duas moléculas de dsDNA. Tanto a formação do filamento de RecA quanto a reação de troca de fitas são iniciadas a partir da região de lacuna do dsDNA (a reação envolvendo 4 fitas sempre se inicia como uma reação de 3 fitas). (C) Formação da alça-D. Após a formação do filamento de RecA sobre o ssDNA, RecA promove o pareamento de um segmento do DNA simples-fita com o dsDNA homólogo através da invasão do terminal  $3'$  do ssDNA.

FONTE: Cox, 2003.

Na reação de troca de fitas de DNA, a região C-terminal da proteína RecA presente no filamento de RecA modula a introdução do dsDNA homólogo (Lusetti & Cox, 2002). O processo fundamental de pareamento e de troca de fitas do DNA ocorre no sulco do filamento de RecA (Howard-Flanders *et al.*, 1984).

### 2.2.3 Atividade ATPásica

Além da família da proteína RecA e proteínas homólogas, a família das tubulinas e a família das actinas também são capazes de formar filamentos e hidrolisar nucleotídeo trifosfatos, processos que apresentam características particulares em cada uma das famílias (Cox, 2003; Roca & Cox, 1997; Lusetti & Cox, 2002).

A hidrólise de ATP mediada por RecA é quase inteiramente DNA-dependente. A hidrólise de ATP independente de DNA é observada apenas em presença de alta concentração molar de sal (1,5-2 mol/L; Pugh & Cox, 1988) e pH 6,0 (Weinstock *et al.*, 1981). O valor de  $k_{cat}$  do monômero ligado ao ssDNA a 37°C é de 30 min<sup>-1</sup>, e quando ligado ao dsDNA decresce para 16-20 min<sup>-1</sup>. Quando RecA está ligada ao ssDNA, a hidrólise de ATP ocorre de maneira independente do pH entre 5,5 e 9, já quando ligada ao dsDNA, a hidrólise de ATP ocorre somente em pH entre 5,5 e 6,5 (Weinstock *et al.*, 1981). O  $S_{0,5}$  é aproximadamente 50 µmol/L (Menge & Bryant, 1992). A proteína RecA hidrolisa uma variedade de NTPs e dNTPs, mas apenas dATP, dUTP, UTP, ATP e GTP servem de cofatores para algumas reações mediadas por RecA (Menetski & Kowalczykowski, 1989; Weinstock *et al.*, 1981; Menge & Bryant, 1992). A hidrólise de ATP ocorre uniformemente através do filamento de RecA (Brenner *et al.*, 1987), não há evidências de aumento dessa taxa nas suas extremidades. Na ausência de qualquer agente que altere a atividade ATPásica intrínseca de RecA, a taxa de hidrólise de ATP é diretamente proporcional à quantidade de monômeros de RecA ligados ao DNA (Shan *et al.*, 1997; Drees *et al.*, 2004a, 2004b).

De acordo com a disponibilidade de ATP ou análogos de ATP e íons  $Mg^{2+}$  o filamento de RecA pode apresentar quatro estados funcionais, denominados O, A<sub>c</sub>, A<sub>o</sub> e P (Lusetti & Cox, 2002; Cox, 2003; Cox *et al.*, 2005). O estado O, inativo, é encontrado na ausência de ATP ou análogos de ATP, ou na presença de ADP. A ligação ao DNA em presença de ATP, ATPγS ou dATP modifica a estrutura para a



forma ativa, denominada A. Existem pelo menos duas formas ativas do filamento de RecA, as quais podem ser interconvertidas entre si dependendo da disponibilidade de íons  $Mg^{2+}$ . Quando a concentração de  $Mg^{2+}$  é comparável com a concentração de ATP, há pouco  $Mg^{2+}$  livre presente, o filamento de RecA assume a conformação denominada fechada ( $A_c$ ). Nessa forma, a troca de fitas só ocorre se o dsDNA linear homólogo apresenta um terminal 3' simples-fita (Lusetti *et al.*, 2003). Este é o estado em que RecA apresenta uma capacidade de pareamento restrita. Em condições de excesso de  $Mg^{2+}$  em relação à concentração de ATP, a troca de fitas ocorre de forma bastante eficiente e independente da presença do terminal 3' do dsDNA, (Cox & Lehman, 1981a; Lusetti *et al.*, 2003; Shan *et al.*, 1996). Nesse estado, o filamento assume a conformação dita aberta ( $A_o$ ). A mudança da conformação  $A_c$  para  $A_o$  é mediada pela interação direta entre os íons  $Mg^{2+}$  e a proteína RecA e envolve 17 resíduos da região C-terminal (Lusetti *et al.*, 2003). Quando estes resíduos são deletados da proteína, o requerimento do excesso de  $Mg^{2+}$  é eliminado, pelo menos para a reação de troca de fitas (Lusetti *et al.*, 2003).

Perante a introdução de uma outra fita de DNA no filamento de RecA, a conformação do filamento de RecA é convertida ao estado P. Nesse estado, a velocidade de hidrólise de ATP é reduzida em 30% (Bedale & Cox, 1996; Schutte & Cox, 1987), há um maior grau de cooperatividade intermonômeros na hidrólise de ATP (Arenson *et al.*, 1999; Haruta *et al.*, 2003; Shan & Cox, 1996) e a velocidade de dissociação dos monômeros é duplicada em relação à observada no estado A, indicando que a introdução da segunda fita de DNA no filamento de RecA modifica o seu estado funcional (Shan & Cox, 1996, 1997; Cox, 2003; Lusetti *et al.*, 2003; Haruta *et al.*, 2003). Uma vez que a conformação P reflete o estado do filamento de RecA capaz de promover a troca de fitas de DNA, as particularidades dessa conformação passaram a ser foco extensas investigações (Cox *et al.*, 2005) realizadas utilizando informações relativas à conformação A (Arenson *et al.*, 1999).

Baseando-se nos valores de  $k_{cat}$  para a hidrólise de ATP ( $30 \text{ min}^{-1}$ ) e na taxa de dissociação dos monômeros de RecA presentes no filamento de RecA formado no ssDNA (60-70 monômeros/min), Arenson *et al.* (1999) sugeriram que os ciclos de hidrólise de ATP no ssDNA ocorrem de forma desacoplada. O  $k_{cat}$  para a hidrólise de ATP dos monômeros de RecA presentes no filamento de RecA formado no dsDNA é

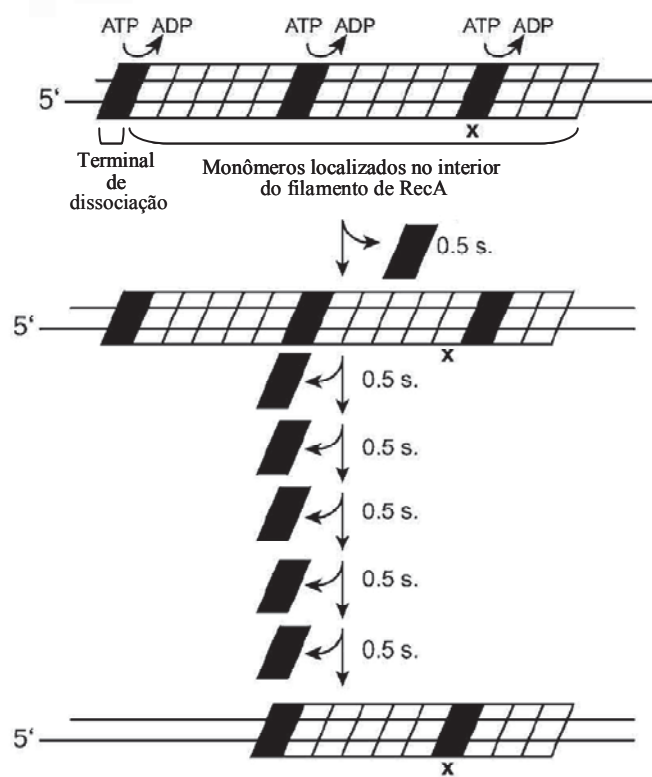
de  $20 \text{ min}^{-1}$  e a taxa de dissociação do dsDNA é três vezes maior do que a taxa predita para uma situação de não acoplamento entre os ciclos de hidrólise de ATP entre os monômeros adjacentes ( $120 \text{ monômeros/min}$ ), indicando uma elaborada coordenação entre os ciclos de hidrólise de ATP entre os monômeros adjacentes (Cox *et al.*, 2005).

A razão  $k_{\text{off}}/k_{\text{cat}}$  no dsDNA, considerando  $k_{\text{off}}$  o número de monômeros de RecA dissociados a partir do respectivo terminal por minuto ( $120 \text{ monômeros/min}$ ) e  $k_{\text{cat}}$  a quantidade de ATP hidrolisado por monômero por minuto ( $20 \text{ min}^{-1}$ ), indicou que o ciclo de hidrólise de ATP no dsDNA ocorre em um intervalo (i) de 6 monômeros ( $k_{\text{off}}/k_{\text{cat}} = i$ ,  $120/20 = 6$ ; Figura 2.7). Uma vez que há seis monômeros de RecA em cada volta helicoidal do filamento de RecA (Figura 2.3), este padrão de hidrólise de ATP pela RecA revela que a hidrólise de ATP ocorre nos monômeros alinhados na face longitudinal do filamento (Figura 2.8; Lusetti & Cox, 2002; Cox *et al.*, 2005). Essas linhas de hidrólise de ATP procedem ao redor da circunferência do filamento em seis etapas, realizadas num intervalo de 0,5s (Cox *et al.*, 2005; Figura 2.7). Apenas a hidrólise de ATP pelo monômero presente no terminal de dissociação do filamento de RecA resulta na sua dissociação (Figura 2.6; Shan *et al.*, 1997; Shan & Cox, 1996; Cox *et al.*, 2005).

A estrutura tridimensional de RecA não revelou nenhum contato entre uma subunidade de RecA de um hexâmero com outra subunidade localizada 6 monômeros de distância (Story *et al.*, 1992, Story & Steitz, 1992). Isto sugere que a coordenação da hidrólise de ATP no filamento seja efetuada apenas pelo contato entre os monômeros adjacentes. Como a hidrólise de ATP ocorre a cada 6 monômeros, pode-se esperar em uma hélice de RecA 6 diferentes conformações. Em concordância com essa sugestão, VanLook *et al.* (2003a) mostraram a presença de diferentes conformações da proteína presente no filamento de RecA formado no dsDNA.



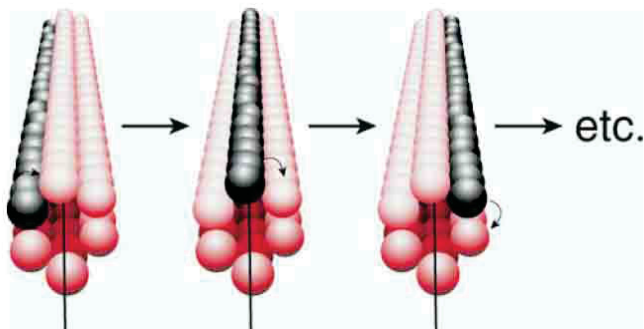
FIGURA 2.7 - ONDAS DE HIDRÓLISE DE ATP NO FILAMENTO DE RecA.



O intervalo (i) entre os monômeros que estão realizando hidrólise de ATP é 6. Os monômeros representados em preto são aqueles que estão na etapa de hidrólise de ATP do ciclo. Cada monômero do filamento (exemplo: o que está destacado por “x”) está hidrolisando o ATP a cada 3 seg. A hidrólise de ATP do último monômero está associada à dissociação.

Fonte: Cox *et al.*, 2005

**FIGURA 2.8 - COORDENAÇÃO DAS ONDAS DE HIDRÓLISE DE ATP NO FILAMENTO DE RecA.**



Os monômeros em preto são aqueles que estão na etapa de hidrólise de ATP do ciclo. As etapas sucessivas são separadas por um período de 0,5 seg. O modelo mostrado assume exatamente os seis monômeros por volta da hélice e  $i = 6$ .

FONTE: Cox *et al.*, 2005.

A atividade de hidrólise de ATP mediada por RecA tem sido objeto de discussão por mais de duas décadas (Cox & Lehman, 1981a, 1981b, 1987; Cox, 1994; Roca & Cox, 1997; Bianco *et al.*, 1998; Courcelle *et al.*, 2001; Cox, 2003; Cox *et al.*, 2005). Como apenas a hidrólise de ATP do monômero presente próximo ao terminal 5' resulta em dissociação, foi sugerido que a hidrólise de ATP realizada pelos demais monômeros no interior do filamento de RecA capacita a proteína RecA a agir como proteína motora (*RecA motor*). Essa capacidade adicional tem sido associada ao processo de troca de fitas pois várias evidências sugerem que a hidrólise de ATP: (1) induz a unidirecionalidade do movimento do DNA heterólogo, na reação de troca de fitas (Shan *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 1994), (2) torna o processo de troca de fitas mais eficiente (Shan *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 1994), (3) capacita a proteína RecA a catalisar a troca de fitas de DNA contendo regiões não homólogas (*bypass*) (Kim *et al.*, 1992; Shan *et al.*, 1996) e a catalisar a troca de quatro fitas de DNA (Kim *et al.*, 1992; Shan *et al.*, 1996; Shan & Cox, 1998). O acoplamento entre a taxa de hidrólise de ATP e a migração do DNA heterólogo na reação de troca de fitas de DNA foi verificada (Bedale & Cox, 1996). A função motora de RecA também promove a regressão da forquilha de replicação, etapa essencial para a efetivação do reparo por recombinação

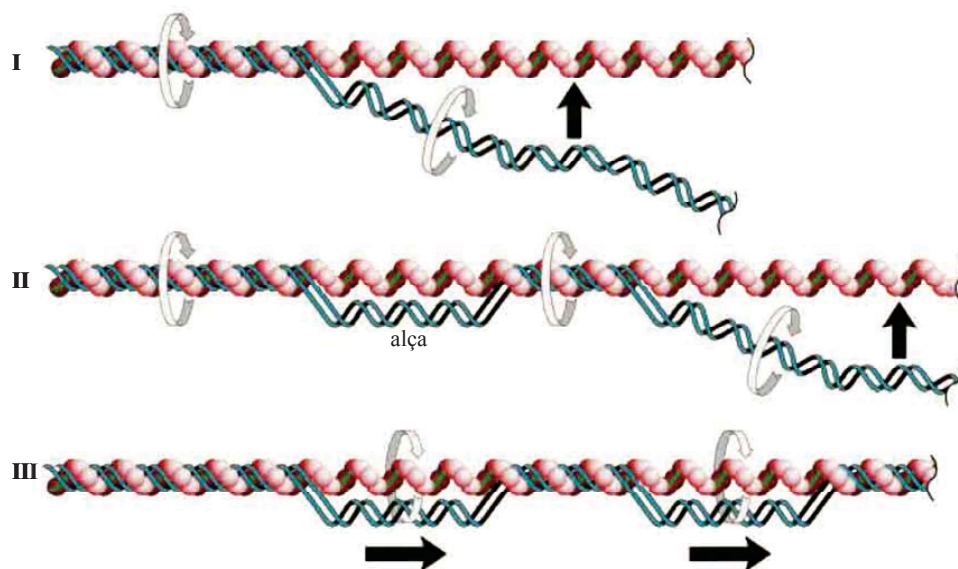
(seção 2.1.1.1; Cox *et al.*, 2000; Cox, 2003; Lusetti & Cox, 2002; Michel *et al.*, 2001; McGlynn & Lloyd, 2002).

#### 2.2.3.1 Troca de fitas x Hidrólise de ATP

Segundo Cox (2003), muitas idéias abordando o acoplamento da hidrólise de ATP com a troca de fitas mediada por RecA foram testadas e descartadas ao longo das duas últimas décadas. Atualmente, dois modelos são aceitos: o que associa a hidrólise de ATP à redistribuição dos monômeros de RecA no filamento de RecA e o que acopla a rotação do ssDNA e do dsDNA homólogo, um sobre o outro, à hidrólise de ATP (Cox, 2003). Como o modelo de redistribuição conflita com alguns resultados experimentais, apenas o modelo rotacional do DNA será descrito.

O modelo que acopla a hidrólise de ATP à rotação do DNA propõe que a troca de fitas de DNA ocorre de forma menos eficiente na ausência de hidrólise de ATP em decorrência da formação de pareamentos improdutivos ou outras interações entre o complexo ssDNA-RecA e o dsDNA homólogo (Figura 2.9, II). Esses pareamentos secundários bloqueiam a troca de fitas (Shan *et al.*, 1996, Rice *et al.*, 2001; Sigurdsson *et al.*, 2001) e geram múltiplas alças externas. Na presença da proteína RecA, numa reação acoplada à hidrólise de ATP, essas alças podem ser resolvidas através da sua rotação ao redor do eixo do filamento de RecA (Figura 2.9, III). Acredita-se que essa rotação seja mediada pela ligação do dsDNA a sítios externos de ligação ao DNA localizados provavelmente na região C-terminal da RecA (posicionada externamente ao filamento de RecA; Yu *et al.*, 2001). Sabendo-se que cada volta do filamento helicoidal de RecA é formada por 6 monômeros, há 6 sítios de ligação para o DNA disponíveis por volta. O DNA desloca-se unidirecionalmente de um sítio para outro após a hidrólise de ATP. Esse deslocamento gera o movimento de rotação necessário para a efetivação da troca de fitas de DNA. Seis moléculas de ATP são hidrolisadas para fornecer energia para uma rotação de 360° nas moléculas de ssDNA e dsDNA ao redor dos seus próprios eixos. A reação de troca de fitas através de inserções heterólogas (*bypass*) e a reação de troca de 4 fitas são explicadas através desse modelo (Cox, 2003).

**FIGURA 2.9 - MODELO DE TROCA DE FITAS ENTRE ssDNA e dsDNA NO QUAL A ROTAÇÃO DO DNA ESTÁ ACOPLADA À HIDRÓLISE DE ATP.**



Modelo que acopla o requerimento da hidrólise de ATP à necessidade de promover a rotação do dsDNA homólogo ao redor o filamento de RecA para a efetivação da reação de troca de fitas de DNA mediada pela proteína RecA. Nesse modelo, pareamentos secundários bloqueiam a troca de fitas e geram múltiplas alças externas (II). Na presença da proteína RecA, numa reação acoplada à hidrólise de ATP, essas alças podem ser resolvidas através da sua rotação ao redor do eixo do filamento de RecA (III). As setas brancas indicam o sentido de rotação das alças e as setas pretas a direção da troca de fitas.

FONTE: Cox, 2003.

### 2.3 Estrutura da proteína RecA

A estrutura do filamento RecA-DNA tem sido amplamente caracterizada por microscopia eletrônica (EM). A proteína RecA liga-se ao DNA numa estequiometria de 3 nucleotídeos (ssDNA) ou 3 pb (dsDNA) por monômero de RecA formando um filamento helicoidal voltado para a direita denominado filamento de RecA (Figura 2.3; Di Capua *et al.*, 1982). Uma volta completa da hélice de RecA contém 6 monômeros e os hexâmeros não interagem entre si (Story *et al.*, 1992, Story & Steitz, 1992).

A estrutura do filamento de RecA pode assumir duas formas gerais, a comprimida (inativa) ou estendida (ativa). O filamento inativo é formado pela proteína sozinha, pela proteína ligada ao DNA na presença de ADP ou ausência de ATP ou análogos de ATP. O filamento comprimido apresenta 6,2 subunidades/volta e a distância entre os hexâmeros adjacentes de RecA (*pitch*) é de 65 Å (Stasiak &

Egelman, 1988; Heuser & Griffith, 1989). O filamento estendido é formado por RecA, ssDNA (ou dsDNA) e ATP ou (análogos de ATP). Este filamento apresenta também 6,2 subunidades/volta, mas a distância entre os hexâmeros é de aproximadamente 95 Å (Di Capua *et al.*, 1982; Egelman & Stasiak, 1986; Yu & Egelman, 1992). No filamento ativo, o DNA apresenta-se aproximadamente 50% desenrolado em relação à forma B do DNA (Stasiak & DiCapua, 1982).

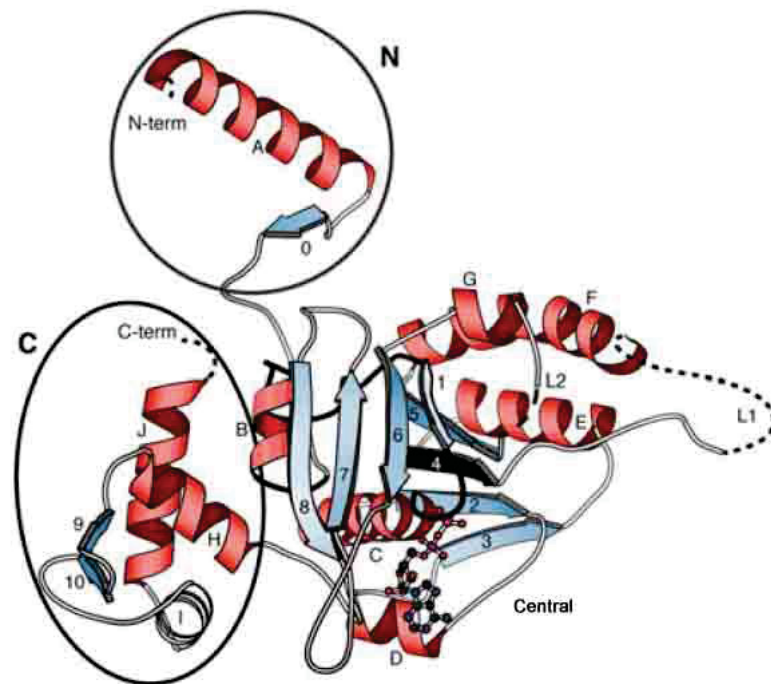
A estrutura da proteína RecA ou RecA complexada ao ADP de *E. coli* foi determinada através de análises cristalográficas de raios-X há mais de uma década (Story & Seifert, 1992; Story *et al.*, 1992). No cristal, foi verificada a mesma organização helicoidal visualizada anteriormente por microscopia eletrônica (DiCapua *et al.*, 1982) e uma distância entre os hexâmeros adjacentes de 83 Å.

Cada monômero apresenta três domínios (Figura 2.10; Story *et al.*, 1992). O domínio N-terminal (aa 1-33) é formado por  $\alpha$ -hélice ( $\alpha A$ ) e folha  $\beta$  ( $\beta 0$ ) (Figura 2.10 e 2.11). O domínio Central (aa 34-268) consiste de 8 folhas  $\beta$  ( $\beta 1 \rightarrow \beta 8$ ) e por 6  $\alpha$ -hélices ( $\alpha B \rightarrow \alpha G$ ). Este domínio contém o sítio de ligação para o ATP, os motivos Walker A (aa 66-73) e B (aa 195-209), e as regiões de ligação do DNA, designadas L1 (aa 157-164) e L2 (aa 195-209). Os resíduos 269-352 formam o domínio menos conservado, o domínio C-terminal, que consiste de 3  $\alpha$ -hélices e 2 folhas  $\beta$ . Esse se projeta para fora do filamento de RecA, estabilizando interações entre polímeros do cristal. Os resíduos 329-352 formam uma cauda altamente negativa e desordenada na estrutura do cristal (revisado por McGrew & Knight, 2003). No filamento de RecA, a região N-terminal de um monômero interage com a região C-terminal do monômero adjacente através de uma ampla interface.

Mais recentemente foram obtidos cristais da proteína RecA e RecA complexada com ADP, ATP $\gamma$ S, dATP, Mg-ATP $\gamma$ S ou ADP-AlF $_4$  de *M. tuberculosis* (Datta *et al.*, 2000, 2003a) e da RecA de *M. smegmatis* complexada com ADP, ATP $\gamma$ S ou dATP (Datta *et al.*, 2003b). Em geral, as características estruturais da proteína RecA de micobactéria se mostraram bastante similares às aquelas apresentadas pela RecA de *E. coli*. A análise de cristais da proteína RecA de *E. coli* na presença de íons cálcio, sulfato e fosfato ressaltam a alta variabilidade conformacional da proteína no

estado cristalino e o envolvimento do domínio C-terminal nas interações entre os filamentos de RecA presentes nos feixes (*bundles*; Xing & Bell, 2004).

**FIGURA 2.10 - MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA RecA.**



Monômero de RecA ligado ao ADP. As folhas- $\beta$  estão sendo representadas com números e as  $\alpha$ -hélices, com letras. Os domínios N- e C-terminal estão circutados. A molécula de ADP se encontra ligada ao domínio Central.

FONTE: Cox, 2003.

**FIGURA 2.11 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA RecA DE DIVERSOS MICRORGANISMOS.**



O alinhamento foi feito utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A numeração dos resíduos se refere à sequência da proteína RecA de *E. coli*. As regiões de  $\alpha$ -hélice e folha  $\beta$  estão destacadas em cinza e as regiões de alça, em azul. A localização dos motivos MAW, Walker A e Walker B, das regiões de interface entre os oligômeros (M-M) e dos sítios de ligação do DNA (L1 e L2) estão indicados. Aminoácidos idênticos estão indicados por asterisco (\*), substituições conservadas, por dois pontos (:) e substituições semi-conservadas por um ponto (.). ECOLI - *Escherichia coli*, HSEROP - *Herbaspirillum seropedicae*, PAERUG - *Pseudomonas aeruginosa*, SLIV - *Streptomyces lividans*.



Como não foram obtidos cristais da proteína RecA na sua forma ativa (RecA-ssDNA-ATP), reconstituições deste filamento continuam sendo feitas e analisadas por EM. Estudos utilizando dicroísmo linear revelaram que no filamento ativo a região central da proteína RecA sofre uma rotação de 40° em relação a sua posição no filamento inativo (Morimatsu *et al.*, 2002). Em concordância com essa observação, análises por EM de filamentos ativos de RecA mostraram que a região de interface entre as subunidades de RecA apresenta-se reorientada (VanLook *et al.*, 2003a), em relação àquela caracterizada na estrutura cristalina do filamento (Story *et al.*, 1992). Com essa reorientação, o sítio de ligação para o ATP passa a ocupar a região de interface intermonômeros (VanLook *et al.*, 2003a), sugerindo uma função adicional ao nucleotídeo ligada à estabilização da forma oligomérica de RecA. Além disso, foi observado que o domínio C-terminal da proteína RecA presente no filamento sofre uma reorientação de ~10° (Yu *et al.*, 2001; VanLook *et al.*, 2003a). Lusetti e colaboradores (2003) especulam que na forma inativa os domínios Central e C-terminal adquirem uma conformação fechada impedindo a ligação do dsDNA e conseqüentemente o processo de recombinação. A rotação da região C-terminal poderia induzir a formação de uma estrutura aberta, capaz de realizar esse processo (Lusetti *et al.*, 2003).

### 2.3.1 Sítios de ligação do DNA

Análises de uma série de estruturas da proteína RecA de *M. tuberculosis* (MtRecA) formando complexo com diversos nucleotídeos (Datta *et al.*, 2003a) confirmaram a proposta de Story e colaboradores (1992) quanto às regiões da proteína RecA envolvidas na ligação do DNA. A alça 2 (L2; resíduos 195-209) e alça 1 (L1; resíduos 157-164) são os sítios de ligação do ssDNA e dsDNA, respectivamente (Figura 2.10 e 2.11; Story *et al.*, 1992).

A caracterização bioquímica de um duplo mutante na alça L1 (E156L e G157V) levou Mirshad & Kowalczykowski (2003) a sugerirem que L1 pode participar da ligação tanto do dsDNA quanto do ssDNA. Além disso, a extremidade da região C-terminal de RecA (aa 329-352), região não resolvida nas estruturas de RecA

publicadas, apresenta uma importante função na regulação da ligação do dsDNA ao sítio L1 (Eggler *et al.*, 2003; Lusetti *et al.*, 2003). As evidências sugerem que na ausência de íons  $Mg^{2+}$  uma rede de pontes salinas são formadas entre os resíduos negativamente carregados da região C-terminal (resíduos de aspartato nas posições 336, 340, 341 e 351 e glutamato nas posições 343, 347 e 350) e os resíduos positivos do restante da estrutura. Na ausência de íons  $Mg^{+2}$ , a região C-terminal da proteína RecA está numa conformação fechada. Por outro lado, na presença de 6-10 mmol/L de  $Mg^{2+}$ , as pontes salinas são quebradas, permitindo que a região C-terminal adquira uma conformação aberta, permitindo o acesso do dsDNA ao filamento de RecA e aumentando a atividade de troca de fitas de DNA (Lusetti *et al.*, 2003).

### 2.3.2 Sítios de ligação e hidrólise de ATP

#### 2.3.2.1 Motivo Walker A

O motivo Walker A, definido como GpESsGKT (Walker *et al.*, 1982), compreende os resíduos 66-73 da proteína RecA de *E. coli* e está presente entre a região  $\beta 1$  e  $\alpha C$ . Essa seqüência é altamente conservada e se mostrou idêntica em 61 de 64 proteínas RecA bacterianas comparadas (Karlin & Brocchieri, 1996; Roca & Cox, 1997). Este motivo é freqüentemente observado em proteínas que ligam ATP ou GTP e está tipicamente envolvido na ligação estável ao NTP (Saraste *et al.*, 1990). O sítio de ligação do ATP encontra-se na superfície interna do filamento de RecA inativo (Story & Steitz, 1992) e na região de interface entre os monômeros no filamento ativo de RecA (VanLook *et al.*, 2003a).

Estudos de mutagênese mostraram que para a manutenção das funções de RecA, os resíduos G66 e E68 são essenciais, já que nenhuma substituição é permitida. Algumas substituições são permitidas nos resíduos S69-T73 (Konola *et al.*, 1994). A proteína mutante RecA K72R é capaz de ligar NTP, mas não é capaz de hidrolisá-lo (Rehrauer & Kowalczykowski, 1993). *In vitro*, esse mutante forma o filamento de RecA no DNA, realiza de forma limitada a reação de troca de fitas (Rehrauer & Kowalczykowski, 1993; Shan *et al.*, 1996) e induz a autoclivagem (co-proteólise) do repressor LexA, mas numa taxa reduzida (Shan *et al.*, 1996). *In vivo*, esta estirpe

mutante apresenta um fenótipo *rec<sup>-</sup>* equivalente ao apresentado quando o gene *recA* é deletado (Konola *et al.*, 1994). A substituição do resíduo P67 por triptofano cria uma proteína RecA com atividade coproteásica constitutiva, porém afeta pouco a função de recombinação. Substituições do resíduo P67 por E, D, K ou R produzem fenótipos diferentes (Konola *et al.*, 1994). As propriedades destes mutantes *in vivo* e *in vitro* têm se mostrado importantes para a caracterização das funções de RecA dependentes da hidrólise de ATP.

#### 2.3.2.2 Motivo Walker B

O motivo Walker B consiste da região 140-144;  $\beta 4$ , e os 4 resíduos centrais são em geral hidrofóbicos (Karlin & Brocchieri, 1996). Uma vez que os resíduos 145-149 estão imediatamente C-terminal ao motivo Walker B e são altamente conservados, sugere-se que essa região apresenta importância funcional ou estrutural no processo de hidrólise de ATP (Karlin & Brocchieri, 1996). A estrutura do complexo MtRecA-NTP revelou que os resíduos V146 e A147 formam pontes de hidrogênio com resíduos próximos a L2 sugerindo que este segmento 145-149 está envolvido na transmissão da mudança estrutural induzida pela ligação do NTP às regiões L2 e L1, coordenando a ligação do ssDNA e dsDNA, respectivamente (Datta *et al.*, 2003a).

#### 2.3.3 Motivo MAW (Make ATP Work)

O motivo estrutural MAW (tgxxxldxalxxGGlxxgxivEiy), que compreende os resíduos 42-65 ( $\alpha B$  e  $\beta 1$ ), é conservado entre as proteínas RecA bacterianas e proteínas homólogas à RecA (Roca & Cox, 1997). Oito dos 24 resíduos são idênticos nas 64 seqüências comparadas da proteína RecA bacteriana (A50, G52, G54, G55, P57, G59, R60 e E63), quatro fazem parte da porção hidrofóbica da proteína (L47, L51, I61, I64; Story *et al.*, 1992) e vários resíduos são conservados. Interações entre os resíduos desse motivo com regiões da proteína RecA envolvidas na ligação de ATP sugerem que este motivo está envolvido na comunicação das mudanças

conformacionais induzidas pela ligação do ATP (Roca & Cox, 1997). O contato do tipo Van der Waals dos resíduos L47 e I64 com L75 e I225 apóia a sugestão de que os resíduos presentes no motivo MAW interagem com as regiões próximas ao motivo Walker A (sítio de ligação do ATP; Logan & Knight, 1993). Foi notado que o resíduo E63 forma uma ligação iônica com R222, resíduo presente na interface da ligação monômero-monômero, importante no contato entre as subunidades (Skiba & Knight, 1994).

Apenas três mutantes nesta região foram caracterizados até o momento: os mutantes *recA13* (L51F) e *recA56* (R60C) apresentaram um fenótipo *rec<sup>-</sup>* enquanto o mutante *recA* (S44L) apresentou a mesma eficiência de recombinação da proteína selvagem (Sommer *et al.*, 1998). A estirpe de *E. coli* contendo a mutação *recA13* mostrou-se sensível à luz UV, apresentou uma recombinação deficiente e não foi capaz de induzir a clivagem do repressor do fago lambda (Willettts & Clark, 1969) ou do repressor LexA (Sassanfar & Roberts, 1990). A estirpe de *E. coli* contendo a mutação *recA56* em adição aos fenótipos citados acima (Lloyd & Low, 1976; Clark, 1967; Horii & Clark, 1973) ainda foi incapaz de induzir a resposta SOS (Bagg *et al.*, 1981; Weisemann *et al.*, 1984) ou promover a mutagenese SOS (Ennis *et al.*, 1989). Ambas as proteínas mutantes RecA L51F e RecA S44L ligam-se ao ssDNA na ausência ou presença de ADP *in vitro*. Entretanto nenhuma das proteínas mutantes foi capaz de ligar ssDNA na presença de ATP ou hidrolisar ATP (Lauder & Kowalczykowski, 1993).

#### 2.3.4 Região de interface dos oligômeros

Na presença de ssDNA (ou dsDNA) e na presença (ou ausência) de ATP, análogos de ATP ou ADP, monômeros de RecA são agrupados entre si de forma cauda-cabeça (C-terminal/N-terminal) e organizados em forma de hélice ao redor do DNA formando o filamento de RecA (Figura 2.3) (revisado por Egelman & Stasiak, 1993; Egelman, 1993). A proteína RecA, na ausência de DNA, também adquire a forma de hexâmero, filamento e feixe (Brenner *et al.*, 1988).

Os resíduos 213-222 ( $\alpha$ G) estão envolvidos no contato monômero-monômero. Esses resíduos são bastante conservados nas 64 seqüências de proteínas RecA bacterianas analisadas (Karlin & Brocchieri, 1996; Roca & Cox, 1997) e estão presentes na região que apresenta maior diminuição da acessibilidade do solvente após o processo de transição monômero  $\rightarrow$  oligômero (Story *et al.*, 1992). Os resíduos N213, K216, F217, Y218 e R222 fazem contatos específicos com 3 regiões da subunidade vizinha: resíduos 94-98 (entre  $\beta$ 2 e  $\alpha$ D), 118-123 (entre  $\beta$ 3 e  $\alpha$ E) e 148-156 (entre  $\beta$ 4 e I1). O resíduo F217 é importante na transmissão da modificação conformacional mediada pela ligação do ATP (Skiba *et al.*, 1999).

Contatos entre subunidades foram observados em duas outras regiões da RecA: entre os resíduos 3-30 ( $\alpha$ A; presentes no domínio N-terminal) em uma subunidade e os resíduos 111-140 ( $\beta$ 3 e  $\alpha$ E; presentes no domínio Central) da subunidade vizinha. Estas duas regiões são formadas por resíduos altamente hidrofóbicos: 6 resíduos de um monômero (L10, A13, L14, I17, F21 e L29) formam uma superfície apolar localizada a uma distância de van der Waals de  $\leq 4\text{\AA}$  de 7 resíduos apolares (I111, L115, I128, A131, L132, A137 e V138) da subunidade vizinha. Apesar de várias interações iônicas e polares ocorrerem também perto desta região hidrofóbica, foi mostrado através da análise de diversos mutantes que a interação entre as subunidades de RecA é determinada prioritariamente por interações hidrofóbicas (Zaitsev & Kowalczykowski, 1999).

### 2.3.5 Domínio C-terminal

O domínio C-terminal da proteína RecA (resíduos 270-352,  $\alpha$ H-J e  $\beta$ 9, 10) é o menos conservado dentre as proteínas RecA bacterianas (Roca & Cox, 1997). Yu *et al.* (2001) sugeriram que esse domínio, ao se movimentar em relação ao domínio Central, pode alternar o estado do filamento de RecA entre as formas ativa e inativa (Yu *et al.*, 2001). Além disso, esse domínio parece mudar de posição dependendo do tipo de nucleotídeo ligado (ATP ou ADP) ao sítio de ligação do ATP, indicando que ele se move durante a hidrólise (VanLook *et al.*, 2003a).

Embora o domínio C-terminal apresente baixa identidade entre as proteínas RecA, a presença de alta concentração de resíduos negativos é quase invariável (Roca & Cox, 1997). Foi proposto que essas cargas negativas regulam a ligação ao dsDNA, repelindo os grupos fosfatos do DNA (Tateishi *et al.*, 1992; Benedict & Kowalczykowski, 1988). O domínio C-terminal está envolvido na interação entre os filamentos de RecA para a formação dos feixes (Story *et al.*, 1992; Xing & Bell, 2004).

### **2.3.6 Regulação alostérica da atividade da proteína RecA (Integração funcional dos domínios de RecA)**

A ligação do ATP ao filamento de RecA promove a sua ativação e a sua conseqüente capacitação para catalisar a troca de fitas de DNA (na recombinação homóloga), induzir a co-proteólise das proteínas LexA e UmuD (na resposta SOS e mutagênese SOS, respectivamente) e efetuar a síntese translesão (na mutagênese SOS). O mecanismo da mudança induzida pela ligação do ATP e a coordenação das atividades de troca de fitas e coproteásica ainda não foram totalmente esclarecidos.

A interação do fosfato  $\gamma$  do ATP com o resíduo Q194 (Story *et al.*, 1992), denominado interruptor alostérico (*allosteric switch*), inicia uma cascata de mudanças conformacionais no filamento de RecA. A ligação do ATP modifica a estrutura da alça 2 (permitindo a ligação do ssDNA à mesma), a superfície intermonômeros e a alça 1 (provavelmente através da região próxima ao motivo Walker B). O motivo MAW é aparentemente o responsável pela transdução do sinal da ligação do ATP intermolecularmente através de múltiplas interações (McGrew & Knight, 2003), estimulando a ligação de ATP nos monômeros adjacentes (Lee & Cox, 1990; Menge & Bryant, 1988). Essas interações tendem a manter todo o filamento no estado ativo. Entretanto os ciclos de hidrólise de ATP entre os monômeros adjacentes no filamento formado no ssDNA ocorrem de forma não coordenada (Shan & Cox, 1996; Arenson *et al.*, 1999). Com a adição da segunda fita de DNA, complementar, os ciclos de hidrólise de ATP tornam-se coordenados (Seção 2.2.3; Shan & Cox, 1996; Cox *et al.*, 2005).



## 2.4 Proteínas Homólogas à RecA bacteriana

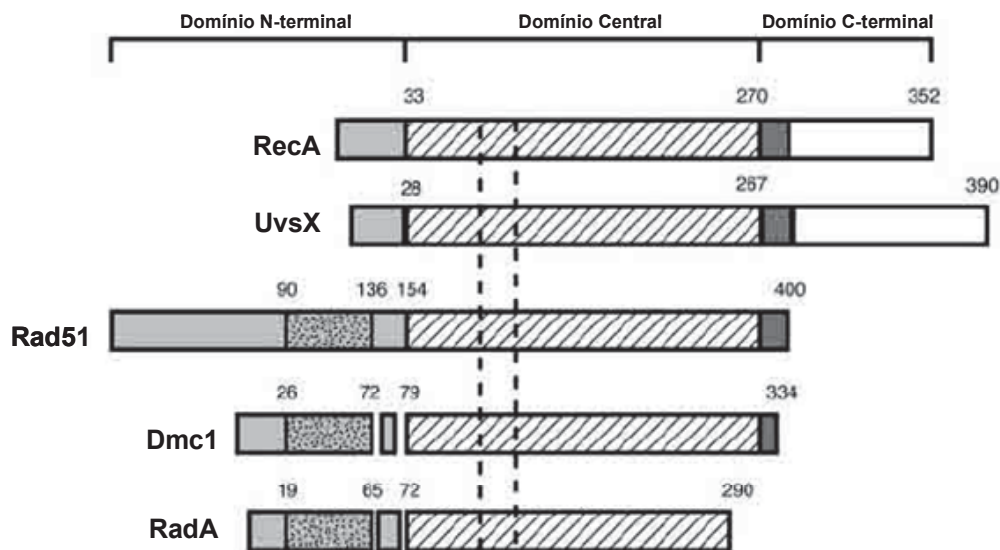
A proteína RecA bacteriana foi o primeiro membro identificado da família das proteínas que catalisam a reação de troca de fitas. Nessa família, incluem-se as proteínas homólogas UvsX do bacteriófago T4 (Kodadek *et al.*, 1988; Beernik & Morrical, 1999), RadA de arqueobactéria (Seitz *et al.*, 1998), Dmc1 (Gupta *et al.*, 2001) e Rad51 (Ogawa *et al.*, 1993; Sung, 1994) de eucariotos. Embora considerados ortólogos estruturais e funcionais, RecA, Rad51 e as demais proteínas exibem algumas diferenças.

O domínio Central das proteínas é o que apresenta maior homologia: há uma identidade próxima de 30% em relação à RecA. A proteína RecA apresenta o domínio C-terminal não encontrado nas proteínas homólogas enquanto as proteínas RadA, Rad51 e Dmc1 apresentam um domínio N-terminal não encontrado em RecA (Figura 2.12; Roca & Cox, 1997; Brendel *et al.*, 1997). Quanto à estrutura do filamento, Dmc1 forma anéis contendo 8 monômeros ao redor do DNA, enquanto as demais proteínas formam uma estrutura hexamérica, como a proteína RecA bacteriana (Seitz *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1993; Griffith & Formosa, 1985; Yu *et al.*, 2001).

A diferença mais significativa entre RecA, Rad51 e UvsX ocorre quanto ao uso do ATP. A proteína Rad51 hidrolisa ATP numa taxa 30-40 vezes menor que RecA (Sung & Stratton, 1996) e UvsX, numa taxa 8-10 vezes maior (Formosa & Alberts, 1986). A proteína RecA geralmente requer a hidrólise de ATP para efetuar a reação de troca de fitas de forma extensiva (Cox, 1994; Jain *et al.*, 1994), enquanto a Rad51 é capaz de realizar a reação completa de troca de fitas na presença de ATP $\gamma$ S ou AMP-PNP, dois análogos não hidrolisáveis do ATP (Sung & Stratton, 1996) e UvsX é capaz de formar intermediários de reação na presença de ATP $\gamma$ S (Yonesaki, 1995). Para a realização da reação de troca de fitas, as proteínas homólogas a RecA também requerem a presença de outras proteínas (Tabela 2.1).



**FIGURA 2.12 - COMPARAÇÃO ENTRUTURAL DOS DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS RecA, UvsX, Rad51 e Dmc1.**



Comparação estrutural das proteínas RecA de *E. coli*, UvsX do bacteriófago T4, Rad51 e Dmc1 de *Saccharomyces cerevisiae* e RadA de *Sulfolobus solfataricus*. O domínio conservado entre todos os organismos (Domínio Central) está destacado por linhas diagonais. O domínio N-terminal conservado entre Rad51, Dmc1 e RadA está destacado por uma região pontilhada. Regiões sem homologia incluem a região em cinza claro e todas as regiões C-terminais ao domínio Central, incluindo o domínio C-terminal das proteínas RecA e UvsX.

FONTE: Lusetti & Cox, 2002.

TABELA 2.1 - PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA.

	BACTÉRIA <sup>§</sup>	BACTERÍÓFAGO <sup>¬</sup>	ARQUEOBACTÉRIA <sup>¢</sup>	EUCARIOTO <sup>#</sup>
<b>Formação do ssDNA</b>	RecBCD	gp46, gp47, gp41, gp59	-	Mre11, Rad50, Xrs2, Spo11
<b>Promoção da troca de fitas de DNA</b>	RecA	UvsX	RadA	Rad51, Dmc1
<b>Ligação ao ssDNA</b>	SSB	gp32	RPA	RPA
<b>Proteínas acessórias</b>	RecF, RecO, RecR	UvsY	RadB	Rad52, Rad55, Rad57, Rad59
<b>Proteínas envolvidas na migração do DNA heteroduplex</b>	RuvA, RuvB RecG	gp41, gp59 UvsW Dda	-	Rad54
<b>Clivagem da estrutura de Holliday</b>	RuvC	gp49	Hjc	-
<b>Outras proteínas</b>	DNA topoisomerase I e II DNA ligase DNA polimerase I	DNA topoisomerases DNA ligase DNA polimerase	DNA ligase PolD	DNA topoisomerases DNA ligases DNA polimerases

<sup>§</sup> E. coli<sup>¬</sup> bacteriófago T4<sup>¢</sup> Pyrococcus furiosus<sup>#</sup> Saccharomyces cerevisiaeFONTE: Bianco *et al.*, 1998 ; Komori *et al.*, 1999, 2000.

## 2.5 Envolvimento de outras proteínas na modulação da atividade da proteína RecA

A modulação das atividades da proteína RecA durante os processos de recombinação homóloga, resposta SOS e/ou mutagenese SOS é efetuada pelas proteínas SSB, LexA, PolV, DinI e RecX e pelos complexos protéicos RecBCD e RecFOR. O envolvimento dessas proteínas na regulação de RecA será descrito a seguir.

### 2.5.1 Proteína ligadora de DNA simples-fita (SSB)

O produto do gene *ssb*, a proteína SSB (~19 kDa), liga-se ao DNA simples-fita de forma cooperativa e com alta afinidade na sua forma tetramérica. A presença de SSB é necessária na recombinação, na resposta SOS, aparentemente na mutagenese SOS (Sweasy, 2005) e em vários estágios da replicação (Meyer & Laine, 1990).

SSB apresenta múltiplas formas de ligação ao ssDNA e a interconversão entre elas é mediada pela concentração de sal (Lohman *et al.*, 1988; Bujalowski *et al.*, 1988; Lohman & Ferrari, 1994). Testes realizados na presença de NaBr, NaCl, NaF, MgCl<sub>2</sub> ou BaCl<sub>2</sub> permitiram generalizar que em concentrações baixas de sal (10-100 µmol/L), cada tetrâmero de SSB liga-se a uma sequência de ~35 nucleotídeos (nt) e em concentrações de 1-10 mmol/L e 0,1-1 mol/L, esse valor aumenta para ~56 e ~65 nucleotídeos, respectivamente (Bujalowski *et al.*, 1988).

A proteína SSB modula a atividade de RecA nos processos de recombinação, resposta SOS e mutagenese SOS: (1) rompendo a estrutura secundária do ssDNA e conseqüentemente promovendo a polimerização de RecA e (2) otimizando a troca de fitas, ligando-se ao ssDNA liberado nos estágios finais dessa reação (Lavery & Kowalczykowski, 1992). SSB inibe a troca de fitas de DNA se for incubada com o ssDNA antes da adição de RecA em reações *in vitro* (Cox & Lehman, 1982), uma vez que SSB pode competir com RecA na ligação ao ssDNA (Tsang *et al.*, 1985; Kowalczykowski & Krupp, 1987; Kowalczykowski *et al.*, 1987). A formação do

complexo RecA-SSB foi verificada em *M. smegmatis* (Reddy *et al.*, 2001), apesar de não haver nenhuma evidência de interação direta entre RecA e SSB em *E. coli*.

### 2.5.2 Proteínas RecF, RecO e RecR

Os produtos dos genes *recF*, *recO* e *recR*, as proteínas RecF (41 kDa), RecO (27 kDa) e RecR (22 kDa), respectivamente, participam do reparo por recombinação de lacunas no DNA geradas devido à interrupção da forquilha de replicação diante de lesões no DNA mediado por RecA. O complexo RecFOR age no estágio inicial do processo interrompendo a inibição de SSB sobre RecA através da direta interação RecO e SSB e conseqüentemente facilitando a associação cooperativa de RecA ao ssDNA e conseqüente formação do filamento de RecA (Umezue *et al.*, 1993; Umezue & Kolodner, 1994). Além disso, sugere-se que as proteínas RecF, RecO e RecR estabilizam o filamento de RecA na região da lacuna no DNA e limitam a degradação do DNA nascente pela nuclease RecJ e pela helicase RecQ (Courcelle *et al.*, 1997, 1999; Courcelle & Hanawalt, 2003).

Webb *et al.* (1997) propuseram que as proteínas RecF, RecO e RecR agem na forma alternativa de complexos RecFR e RecOR, os quais apresentam funções complementares. RecOR e RecFR direcionam a associação ou a dissociação do filamento de RecA, respectivamente (Webb *et al.*, 1997). Courcelle *et al.* (1997) também mostraram a importância das proteínas RecF e RecR para o reinício da replicação. Apesar da aparente estabilidade da interação entre RecR e os filamentos de RecA, a interação direta não foi ainda demonstrada (Bork *et al.*, 2001).

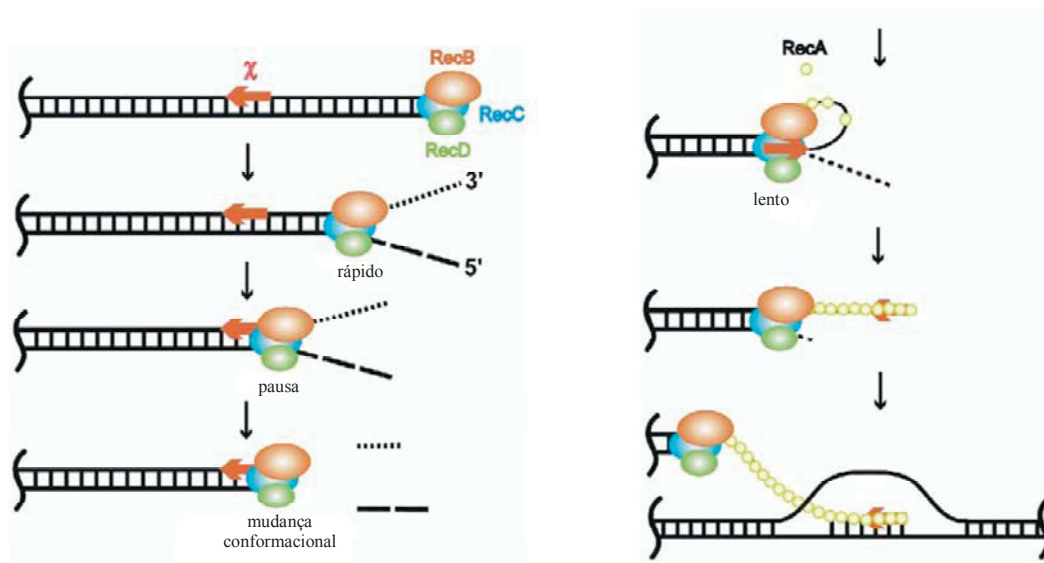
### 2.5.3 Complexo RecBCD

A enzima RecBCD é um complexo multifuncional (330kDa) composto por 3 subunidades, os produtos dos genes *recB*, *recC* e *recD* (Amundsen *et al.*, 1986; Emmerson, 1968; Glickman, 1979). Essa enzima apresenta atividades de nuclease, helicase e ATPase, essenciais para o início do reparo de duplas-quebras no DNA mediado por RecA.

A proteína RecB apresenta atividade de helicase e  $3' \rightarrow 5'$  e RecD, de helicase  $5' \rightarrow 3'$ , respectivamente (Dillingham *et al.*, 2003; Taylor & Smith, 2003) e a proteína RecC reconhece uma sequência específica  $5'$ -GCTGGTGG- $3'$ , chamada sítio *chi* (*crossover hotspot instigators*; Arnold *et al.*, 2000). O complexo RecBCD apresenta atividade nucleásica  $3' \rightarrow 5'$  mais vigorosa que  $5' \rightarrow 3'$  até encontrar o sítio *chi*, momento em que essa atividade é reduzida (Dixon & Kowalczykowski, 1991, 1993) e modificada (a degradação do terminal  $5'$  ssDNA torna-se a mais vigorosa; Anderson & Kowalczykowski, 1997a).

O modelo atualmente aceito para o mecanismo de RecBCD está ilustrado na figura 2.13 (Handa *et al.*, 2005). Nesse modelo, a proteína RecB transloca-se pela fita atrasada na direção  $3' \rightarrow 5'$  e a RecD transloca-se pela fita líder na direção  $5' \rightarrow 3'$  (Dillingham *et al.*, 2003; Taylor & Smith, 2003). A ligação de RecC ao sítio *chi* induz a modificação estrutural do complexo induzindo a uma pausa e a posterior redução da velocidade de translocação do complexo (Spies *et al.*, 2003). Como resultado da atividade de RecBCD, é produzida uma extremidade  $3'$  de DNA simples-fita que serve de alvo para a ligação de RecA. Além de formar o ssDNA, RecBCD, através da interação entre a proteína RecA e a região C-terminal da RecB, apresenta como função direcionar a ligação de RecA ao ssDNA, etapa inicial do processo de recombinação homóloga (Anderson & Kowalczykowski, 1997b; Churchill & Kowalczykowski, 2000; Spies *et al.*, 2003).

**FIGURA 2.13 - MECANISMO MOLECULAR DA FORMAÇÃO DE ssDNA MEDIADO POR RecBCD E *chi*.**



Antes de encontrar o sítio *chi*, RecBCD degrada terminais 3' ssDNA. RecBCD, quando reconhece o sítio *chi*, pára e tem a sua conformação modificada, provavelmente devido à ligação RecC-*chi*. Os terminais ssDNA 5' passam a ser alvo de degradação ao invés daqueles 3' e o complexo tem a sua velocidade de translocação reduzida. A modificação da conformação do complexo também expõe o sítio de interação de RecB com a proteína RecA. Essa interação permite que RecB direcione RecA ao ssDNA 3' produzido. A formação do filamento RecA-ssDNA é a etapa inicial do processo de recombinação homóloga.

FONTE: Handa *et al.*, 2005.

#### 2.5.4 LexA

A proteína LexA (23 kDa) atua como repressor dos genes presentes no regulon SOS ligando-se à sequência operadora desses genes (Courcelle *et al.*, 2001). O repressor LexA, assim como os repressores do fago  $\lambda$  cI e do fago  $\phi 80$  (Little & Mount, 1982) são inativados pela proteína RecA (ligada ao ssDNA e ao ATP) através de interações proteína-proteína (Little, 1993; Luo *et al.*, 2001). A interação RecA:LexA ocorre numa estequiometria 2:1 (Yu & Egelman, 1993). Um dos pontos de contato de LexA com o filamento de RecA encontra-se na região interna do filamento de RecA, região esta que se estende do motivo Walker A até a região onde estão acomodados os resíduos G229 e R243 e o segundo ponto encontra-se na região L1 (Yu & Egelman, 1993). A superfície formada entre os dois pontos de contato acomoda proteínas do tamanho de LexA, dos outros repressores e de UmuD. Evidências bioquímicas apóiam a idéia de que L1 não serve apenas como sítio de

ligação do DNA, mas também faz parte do sítio de ligação do substrato coproteásico. Tais evidências indicam que os processos de recombinação, resposta SOS e mutagênese SOS são mutuamente exclusivos (Harmon *et al.*, 1996). A proteína RecA ao se ligar ao complexo UmuD'<sub>2</sub>C torna-se incapaz de mediar a clivagem de LexA ou promover o alinhamento entre seqüências homólogas (Rehrauer *et al.*, 1998; Rehrauer & Kowalczykowski, 1996). Essa competição é observada também quando há excesso de ssDNA ou dsDNA, condição em que a atividade coproteásica é inibida (Rehrauer *et al.*, 1996). Quando RecA é incubada com uma forma não hidrolisável de LexA, a troca de fitas é inibida (Harmon *et al.*, 1996). Esses resultados indicam que o complexo UmuD'<sub>2</sub>C, a proteína LexA e o dsDNA apresentam sítios de interação sobrepostos no sulco profundo da hélice do filamento de RecA (Yu & Egelman, 1993; Story *et al.*, 1992).

#### 2.5.5 DNA polimerase V

A DNA polimerase V (polV; 70 kDa) é formada por duas subunidades de UmuD' e uma subunidade de UmuC. PolV é uma das polimerases indutoras de erro envolvidas na restauração da integridade genômica na presença de DNA lesado (revisado por Goodman, 2002). Foi verificado por Schlacher *et al.* (2005) que a polV interage com a proteína RecA de 2 maneiras: (1) RecA interage com a proteína UmuC, mesmo na ausência de DNA e (2) RecA é capaz de interagir com UmuD', na presença de DNA e de ATP. Baseando-se nestas duas maneiras de interação, foi proposto um modelo de interação envolvendo dois monômeros de RecA e o complexo UmuD'<sub>2</sub>C (seção 2.1.3).

#### 2.5.6 DinI

A proteína DinI (~9 kDa), produto do gene *dinI* (*damage induced gene*), estabiliza o filamento de RecA, reduzindo ou prevenindo a dissociação do mesmo quando está presente em excesso (15 vezes a concentração molar de RecA; Lusetti *et al.*, 2004a). A maior estabilidade do filamento de RecA não altera a atividade de



hidrólise de ATP intrínseca de RecA (Yasuda *et al.*, 2001), a atividade coproteásica quando LexA é o substrato, nem a atividade de troca de fitas, diante de dsDNAs contendo terminal 3' simples-fita (Lusetti *et al.*, 2004a). Assim, DinI parece modular positivamente RecA, com apenas uma exceção: DinI inibe a indução da autoclivagem de UmuD (Yasuda *et al.*, 2001). Em altas concentrações (20 a 100 vezes maior que RecA), DinI induz a desestabilização do filamento de RecA, inibindo todas as atividades de RecA (Voloshin *et al.*, 2001; Lusetti *et al.*, 2004a).

A proteína DinI liga-se ao filamento de RecA ativo e inativo numa relação de 1:1 (Voloshin *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2001), mas não ao ssDNA diretamente (Yasuda *et al.*, 2001). Análises comparativas quanto à afinidade de ligação pelo filamento de RecA mostraram que LexA liga-se mais fortemente, seguido de DinI e UmuD. Voloshin *et al.* (2001) mostraram que DinI se liga no domínio Central de RecA, mais precisamente na região L2, bloqueando possivelmente a ligação da proteína UmuD e do ssDNA (Yoshimasu *et al.*, 2003).

### 2.5.7 RecX

O gene *recX* foi descrito pela primeira vez em 1993 por Sano em *Pseudomonas aeruginosa* como uma região codificadora de proteína localizada a jusante de *recA*. Desde este estudo, genes homólogos a *recX* foram identificados a jusante de *recA* em muitos organismos. Dentre as bactérias e as arqueobactérias que tiveram seu genoma totalmente seqüenciado e depositado no banco de dados GenBank, o gene *recA* foi identificado em respectivamente 43 espécies. Genes homólogos a *recX* foram identificados a jusante de *recA* em 8 das 33 espécies bacterianas cujo genoma foi totalmente seqüenciado: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* e *Thermotoga maritima*. Entretanto em arqueobactérias o gene *recX* não foi identificado.

Foi mostrado que o gene *recX* é co-transcrito com *recA* em *Thiobacillus ferrooxidans* (Guiliani *et al.*, 1997), *Mycobacterium smegmatis* (Papavinasasundaram *et al.*, 1997), *Streptomyces lividans* (Vierling *et al.*, 2000) e *E. coli* (Pagès *et al.*, 2003) e

em *P. aeruginosa* (Horn & Ohman, 1988). Em *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, embora *recX* esteja localizado a jusante de *recA* numa organização genética *lexA-recA-recX*, os três genes são transcritos a partir de promotores próprios. Em *Neisseria gonorrhoeae* e *Bacillus subtilis* o gene *recX* não está localizado a jusante de *recA* (Stohl & Seifert, 2001; Kunst et al., 1997).

#### 2.5.7.1 Análises funcional do gene *recX*

Sendo *recX* um gene constituinte do regulon SOS, sua expressão também está sob controle do repressor LexA. Em *E. coli*, a expressão constitutiva do gene *recX* é 300 vezes menor do que a de *recA* (Stohl et al., 2003). Nessa condição, são encontradas em média, por célula, 50 moléculas de RecX e 15.000 moléculas de RecA. Com a indução da resposta SOS, a razão RecX:RecA é alterada para 1:125 (Stohl et al., 2003). Nessa condição cada célula possui aproximadamente 800 moléculas de RecX e 100.000 moléculas de RecA por célula (Stohl et al., 2003). A diferença de concentração de RecA e RecX ocorre porque a eficiência da RNA polimerase em superar o sítio atenuador presente na região intergênica *recAX* é de apenas 5 a 10% (Pagès et al., 2003).

A superexpressão da proteína RecA, no mutante *recX* de *P. aeruginosa* (Sano, 1993), *M. smegmatis* (Papavinasasundaram et al., 1998), *Xanthomonas oryzae* (Sukchawalit et al., 2001) e *S. lividans* (Vierling et al., 2000) é letal, sugerindo que a função da proteína RecX está relacionada com o controle da atividade de RecA na célula. Mutantes *recX* de *E. coli*, entretanto, não apresentaram esse fenótipo de letalidade em condições de superexpressão de RecA (Pagès et al., 2003).

A mutação do gene *recX* de *P. aeruginosa* (Sano, 1993) e *S. lividans* (Vierling et al., 2000) não alterou os fenótipos relacionados às atividades de RecA. Em *E. coli*, por outro lado, enquanto Pagès et al. (2003) verificaram o mesmo que Sano (1993) e Vierling et al. (2000), Stohl et al. (2003) mostraram que o mutante *recX* de *E. coli* tinha uma resistência menor à luz UV.

A superexpressão do gene *recX* em *E. coli* com expressão normal de *recA* provocou o aumento da sensibilidade à luz UV, inibição tanto da clivagem das proteínas LexA e UmuD e indução da resposta SOS (Stohl *et al.*, 2003). Quando analisados em conjunto, esses resultados indicam o envolvimento da proteína RecX como moduladora negativa das atividades de RecA.

Mutantes *recX* de outros microrganismos apresentaram novos fenótipos: (1) redução do tamanho da colônia em *S. lividans* (Vierling *et al.*, 2000); (2) redução na variação da fase da colônia, na capacidade de transformação de DNA e na capacidade de reparo em *N. gonorrhoeae* (Stohl & Seifert, 2001) e (3) redução de 50% no nível de expressão da proteína RecA em *X. oryzae* pv. *oryzae* (Sukchawalit *et al.*, 2001). Esse último fenótipo sugere uma função alternativa para a proteína RecX que estaria atuando como moduladora positiva da atividade de RecA.

Os genes *recA* e *recX* de *E. coli* quando ensaiados no sistema heterólogo de *N. gonorrhoeae* indicaram que a proteína RecX de *E. coli* estabiliza o transcrito de *recA*, estabiliza a proteína RecA ou de alguma forma aumenta a atividade de RecA quando presente numa concentração inferior a de RecA (Stohl *et al.*, 2002). Por outro lado, altos níveis da proteína RecX inibem ou regulam negativamente a proteína RecA (Stohl *et al.*, 2002).

Diante de uma variedade de fenótipos associados à proteína RecX e várias vezes contrastantes, Stohl *et al.* (2003) sugerem que RecX é uma proteína com múltiplas atividades ou com atividades espécie-específicas. A confirmação dessa sugestão depende da caracterização dessa proteína em outros microrganismos

#### 2.5.7.2 Análises *in vitro* da proteína RecX

Uma característica distintiva apresentada pela proteína RecX é o seu alto pI, cujos valores variam entre 8,5 e 11. Esses valores indicam que a proteína encontra-se positivamente carregada na célula, o que permitiria a sua interação com as cargas negativas do DNA (Venkatesh *et al.*, 2002). Entretanto RecX de *M. tuberculosis* não apresentou atividade de ligação ao DNA (Venkatesh *et al.*, 2002) e RecX de *E. coli*

(Stohl *et al.*, 2003; Drees *et al.*, 2004a) foi capaz de ligar-se ao DNA somente em concentrações acima de 1  $\mu\text{mol/L}$ . Por outro lado, RecX foi capaz de modular as atividades de recombinase e ATPase da proteína RecA através de interação física direta nas mesmas bactérias (Stohl *et al.*, 2003; Venkatesh, *et al.*, 2002).

O mecanismo pelo qual RecX modula as atividades de RecA ainda não é totalmente entendido apesar de muitos grupos de pesquisa estarem estudando esse processo. *In vitro*, a proteína RecX de *E. coli* parece bloquear a extensão do filamento de RecA, provavelmente ligando-se ao monômero de RecA presente no terminal de associação do filamento de RecA (Drees *et al.*, 2004a). Ao impedir a associação dos monômeros ao DNA, RecX aumenta a dissociação líquida dos monômeros do filamento de RecA, e esse aumento se reflete na redução da taxa de hidrólise de ATP (Drees *et al.*, 2004a). O bloqueio da extensão do filamento de RecA é mais efetivo na presença da região C-terminal de RecA e na presença de  $\text{Mg}^{2+}$  numa concentração superior a de ATP (Drees *et al.*, 2004b).

Dados de microscopia eletrônica e de estrutura cristalográfica de RecA (Story & Steitz, 1992; Story *et al.*, 1992) foram utilizados por VanLook *et al.* (2003b) na modelagem da estrutura dos filamentos de RecA (estabilizados pela ligação de AMPPNP) ligados à proteína RecX de *E. coli*. VanLook *et al.* (2003b) sugerem que a proteína RecX se liga ao filamento de RecA entre o domínio C-terminal de uma subunidade e o domínio central da subunidade vizinha, interferindo na interação monômero-monômero. Além disso, foi mostrado que a proteína RecX liga-se à forma inativa do filamento de RecA (VanLoock *et al.* 2003b), resultado consistente com os apresentados por Stohl *et al.* (2003) e Venkatesh *et al.* (2002), os quais mostraram que RecX inibe a atividade de RecA .

Recentemente, Lusetti *et al.* (2004b) apresentaram um modelo envolvendo as proteínas RecX e DinI na regulação dos eventos de associação e dissociação de monômeros no filamento de RecA. Esse modelo baseia-se nos efeitos opostos destas proteínas: RecX induzindo a dissociação dos monômeros do filamento de RecA e DinI aumentando a estabilidade do filamento. A ligação de RecX e DinI ao filamento de RecA foi considerada mutuamente exclusiva. Considerando a concentração requerida de cada proteína para exercer o efeito sobre RecA, sugeriu-se que a ligação RecA-DinI

é mais fraca que RecA-RecX (Lusetti *et al.*, 2004b). Os autores propõem que a adição de DinI induz a dissociação lenta de RecX do filamento de RecA até a sua substituição completa por DinI. Quando DinI encontra-se ligada ao filamento de RecA previamente, RecX induz a sua lenta dissociação também. Como a concentração de RecX necessária para dissociar DinI mostrou-se superior àquela necessária para induzir a dissociação dos monômeros do filamento de RecA na ausência de DinI, Lusetti *et al.* (2004b) sugerem que para a dissociação de DinI, RecX se liga ao longo do filamento, como foi mostrado por VanLook *et al.* (2003b), e não apenas no terminal de extensão, como sugerido por Drees *et al.* (2004 a, b).

#### 2.5.7.3 Análises *in silico* da proteína RecX

O alinhamento da sequência da proteína RecX de diversos organismos mostrou que essa proteína não apresenta alta similaridade entre as espécies, sugerindo que a interação RecA-RecX é variável e espécie-específica (Figura 2.14; Mishra *et al.*, 2003). A proteína RecX de *E. coli* também não apresentou similaridade substancial com nenhuma das proteínas depositadas no banco de dados de proteínas (PDB). Sendo assim, Mishra *et al.* (2003) utilizaram técnicas de previsão da estrutura tridimensional para identificar proteínas que poderiam ter uma estrutura tridimensional similar a de RecX. Todos os métodos de predição revelaram o fator  $\sigma^{70}$  entre as 10 proteínas mais similares. Uma vez escolhido o fator  $\sigma^{70}$  como molde, foi possível delimitar a posição das  $\alpha$ -hélices após o alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas alvo e molde.

O modelo de RecX de *E. coli*, gerado a partir do uso do programa MODELLER (Sali & Blundell, 1993) e estudos de dicroísmo circular, está mostrado na Figura 2.15 (Mishra *et al.*, 2003). Essa proteína apresenta um conjunto de nove hélices e é dividida em dois domínios (Mishra *et al.*, 2003). O domínio C-terminal é formado por duas hélices anfipáticas estabilizadas por interações hidrofóbicas entre os resíduos F165, W162 e F138 e o resíduo básico K141 (Mishra *et al.*, 2003). Nesse domínio foi identificado o motivo hélice volta hélice (HTH) (Mishra *et al.*, 2003). A estrutura de

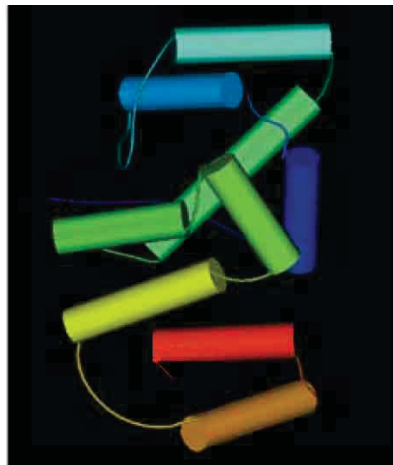
RecX é estabilizada por interações hidrofílicas entre os dois domínios (Mishra *et al.*, 2003).

A previsão da configuração da proteína RecX no hexâmero de RecA mostrou que RecX liga-se em três moléculas consecutivas de RecA no sítio de ligação de ATP e nos sítios de ligação de DNA. Os autores sugerem que RecX, ao interagir com o filamento de RecA, impede a entrada do ATP e da molécula de DNA inibindo as atividades de ATPase, de troca de fita de DNA e de co-protease de RecA (Mishra *et al.*, 2003). A veracidade desse modelo ainda deverá ser demonstrada.

**FIGURA 2.14 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA RecX DE DIVERSOS MICRORGANISMOS.**

	10	20	30	40	50
ECOLI	MTESTSRRPAYARL---	LDRAVRILAVRDHSEQELRRKLAAP	IMGKNGPEEIDATAEDYE		
HSEOP	---MPRPPISLK---	ARALKYLSSREHSRLRLARKLAP	---YAQEGDDIE		
PAERUG	MAIVLDTLPVAVRR---	AAMDLLARREHGRAELSRKLRQ	---RG---	ASAELID	
PFLUOR	MTVVLDTLVAVRR---	TAMDLLARREHGRVELTRKLRQ	---RG---	APEMIE	
MTUB	MTVSCPPSPSTSEREEQARALCLRLLTARSRTAELAGQLAKR	---	---	---	GYPEDIGN
	:	..	*:	*:	..
		αA		αB	
	60	70	80	90	100
ECOLI	RVIAWCHHEGYLDDSRFVARFIASR-SRKGYGPARIROELNQGKISREATEKAMR--	EC			
HSEOP	ALLQWLEQSRFLSQERFSLSVHRR-AAR-YGNQRILSELHGHEGEAIADLKA--	DLA			
PAERUG	PALDRLAEGLLDESRYLESFIASR-ARSGHGPLRIREELAQRGLPRADIERALG--	ACE			
PFLUOR	TALDRLTEEGLLSEARYLESFVSYSR-ARSGYGPARIREELSQRGLPRADIDLALR--	ECG			
MTUB	RVLDRLAAGVLVDDTDFAEQWVQSRRANAASKRALAAELHAKGVDDDVITTVLGGIDAG				
	:	..	:	:	..
	αC		αD		αE
	120	130	140	150	160
ECOLI	IDWCALARDQATRKYGEPPLPTVFSEKVKIQR---	FLLYRGYLMEDIQEIWRNF-AD---			
HSEOP	AGEAERAAQVLRKFT-APPADAETRAKQMR---	FLQQRGFSHRSIREAFQTAWLDEDD			
PAERUG	VDWSAQLREVWRRKFA-RLPQDAREKAQQGR---	FLAYRGYSMESISRLNLGR-SDD--			
PFLUOR	ISWQSLEDTWRRKFAGHLPIDARERAKQGR---	FLSYRGFSMDMISRLLSGRDMDD--			
MTUB	AERGRAEKLVRARLRREVLIDDGTDEARVSRRLVAMLRARGYGQTLACEVVIAELAAERE				
	*	..	:	:	..
	αG		αH		αI
ECOLI	----				
HSEOP	PS--				
PAERUG	----				
PFLUOR	----				
MTUB	RRRV				

O alinhamento foi feito utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A numeração dos resíduos se refere a sequência da proteína RecX de *E. coli*. As regiões de α-hélice estão destacadas em cinza. Aminoácidos idênticos estão indicados por asterisco (\*), substituições conservadas, por dois pontos (:) e substituições semi-conservadas por um ponto (.). ECOLI - *Escherichia coli*, HSEOP - *Herbaspirillum seropedicae*, PAERUG - *Pseudomonas aeruginosa*, PFLUOR - *Pseudomonas fluorescense* e MTUB - *Mycobacterium tuberculosis*.

**FIGURA 2.15 - MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA RecX.**

A estrutura tridimensional da proteína RecX de *E. coli* foi gerada por modelamento. RecX é formada por um conjunto de nove hélices e é dividida em dois domínios. Um domínio C-terminal formado por duas hélices estabilizadas por interações hidrofóbicas.

FONTE: Mishra *et al.*, 2003.



## 2.6 Caracterização do operon *recArecX* e identificação de outros genes envolvidos nos processos de recombinação e reparo SOS em *H. seropedicae*

*Herbaspirillum seropedicae* é uma  $\beta$ -proteobacteria endofítica encontrada associada a várias poáceas de interesse econômico (Baldani *et al.*, 1986; Pimentel *et al.*, 1991; Boddey *et al.*, 1995). Este microrganismo é capaz de fixar nitrogênio em condições de microaerofilia e produz fito-hormônios que beneficiam a planta associada, sendo, portanto, considerado um biofertilizante em potencial (Baldani *et al.*, 1991).

Os estudos do sistema de recombinação e reparo de DNA em *H. seropedicae* foram iniciados com a clonagem e a caracterização parcial do gene *recA* (Steffens *et al.*, 1993). O gene *recA* de *H. seropedicae* foi identificado por complementação genética da estirpe mutante *recA* de *E. coli* HB101 (Steffens *et al.*, 1993). Posteriormente, o seqüenciamento completo de um fragmento de DNA de *H. seropedicae* que continha o gene *recA* revelou a presença contígua do gene *recX*. A caracterização da região regulatória indicou que os genes *recAX* compõem um único operon em *H. seropedicae* (Galvão, 2001).

Com o desenvolvimento do projeto de seqüenciamento completo do genoma de *H. seropedicae* (Genopar) foram identificados outros genes constituintes do regulon SOS e/ou envolvidos nos processos de recombinação e reparo SOS, além dos genes *recA* e *recX*. Os genes *uvrB* e *uvrC* que participam da formação do complexo UvrABC e os genes *recR* e *recO* que participam da formação do complexo RecFOR foram identificados. O gene *recG*, que codifica para a proteína RecG envolvida no processamento da junção de Holliday (Lloyd & Sharples, 1993; West, 1997), além dos genes *recN*, *recJ*, *recQ*, *dinP*, *dinG*, *polB*, *dnaN*, *sbcB* e *uvrD*, foram também identificados em *H. seropedicae*.

A análise comparativa da organização dos genes relacionados com as funções de RecA no genoma de *H. seropedicae* e no genoma dos microrganismos, cuja seqüência completa está depositada no banco de dados Genbank, revelou que os genes *ruvABC*, que codificam para o complexo protéico RuvABC, estão organizados de forma contígua no genoma de *H. seropedicae* assim como no genoma de *E. coli*,

*Mycobacterium sp.*, *P. aeruginosa* e outras bactérias. Os genes *umuD* e *umuC* também estão organizados de forma contígua, como em *E. coli*. Os genes *ssb* e *uvrA*, os quais codificam para a proteína ligadora de ssDNA e uma subunidade do complexo UvrABC, respectivamente, estão localizados adjacentes, porém são transcritos em direções opostas. Nesse caso, a organização se mostra coincidente com a de *E. coli*, *Haemophilus influenza*, *P. aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, entre outros microrganismos. Finalmente, o gene *lexA* foi também identificado no genoma de *H. seropedicae*, o que permite sugerir que a expressão do regulon SOS também é regulada pela proteína LexA.

A função das proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae* no reparo SOS foi investigada através da caracterização de mutantes obtidos por inativação insercional (Galvão, 2001). Análises fisiológicas do mutante CWG2a (*recA::Tn5*) confirmaram que o produto do gene *recA* em *H. seropedicae* é essencial para o reparo SOS (Galvão, 2001; Galvão *et al.*, 2003). O mutante CWG1 (*recX::lacZ-Km*) apresentou sensibilidade à luz UV e ao agente mutagênico metanosulfonato de metila, indicando a participação também da proteína RecX nesse processo, possivelmente modulando a atividade da proteína RecA (Galvão, 2001; Galvão *et al.*, 2003). Para determinar o mecanismo de regulação de RecA pela proteína RecX e contribuir para o avanço da compreensão dos processos de recombinação homóloga e reparo SOS, o objetivo geral desta tese foi a caracterização bioquímica das proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae*. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas experimentais:

- Clonagem dos genes *recA* e *recX* em vetores de expressão;
- Expressão e purificação das proteínas RecA e RecX nas suas formas nativa e ligada à cauda His;
- Determinação da interação entre as proteínas RecA e RecX *in vitro*;
- Determinação da ligação das proteínas RecA e RecX ao DNA *in vitro*;
- Determinação do efeito da proteína RecX sobre as atividades de RecA *in vitro*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais Gerais

##### 3.1.1 Composição dos Meios de Cultura

A composição dos meios de cultura está mostrada na Tabela 3.1. Todos os meios de cultivo bacterianos foram preparados e autoclavados por 20 minutos a 120°C para esterilização como descrito por Sambrook *et al.* (1989).

TABELA 3.1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO BACTERIANOS.

TIPO DE MEIO	COMPOSIÇÃO (por litro de meio)
Luria-Bertani (LB)	10 g triptona, 5 g extrato de levedura e 10 g NaCl.
Luria-Bertani Agar (LA)	10 g triptona, 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl e 15 g ágar.
Terrific Broth (TB)	12 g triptona, 24 g extrato de levedura e 4 mL glicerol.
SOB	20 g triptona, 5 g extrato de levedura, 0,5 g NaCl, 0,19 g/L KCl e 0,2 g/L MgCl <sub>2</sub> .
SOC	20 g triptona, 5 g extrato de levedura, 0,5 g NaCl, 0,19 g/L KCl, 0,2 g/L MgCl <sub>2</sub> , 1,2 g/L MgSO <sub>4</sub> e 3,6 g/L de glucose.

Os meios esterilizados foram suplementados com antibióticos em concentração apropriada para selecionar a estirpe bacteriana e/ou o plasmídeo de interesse. Os antibióticos usados estão listados na Tabela 3.2. Os estoques de ampicilina e canamicina foram esterilizados por filtração (membrana ME25, 0,45 µm, Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel, Germany).

TABELA 3.2 - ANTIBIÓTICOS USADOS NESTE TRABALHO.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE (mg/mL)	CONCENTRAÇÃO DE USO ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Ampicilina (Amp)	100 em água	100
Canamicina (Km)	50 em água	50
Tetraciclina (Tc)	10 em etanol 70%	10
Cloranfenicol (Cm)	30 em etanol	80

### 3.1.2 Soluções e Reagentes

A composição das soluções e dos tampões utilizados neste trabalho está descrita na Tabela 3.3 e Tabela 3.4, respectivamente.

TABELA 3.3 - COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NESTE TRABALHO.

SOLUÇÕES	COMPOSIÇÃO
Acrilamida (30% T <sup>§</sup> , 2,67% C <sup>ε</sup> )	29,2% (p/v) acrilamida e 0,8% (p/v) bisacrilamida.
Corante F. E. FSUDS (5x)	65 mmol/L de Tris-HCl pH8,0; 0,08% (p/v) de azul de bromofenol; 1% (p/v) de SDS; 10% (p/v) de Ficoll; 1,8 mmol/L de EDTA pH 8,0 e 4 mg/mL de xileno cianol.
Solução de Azul de Coomassie para coloração proteína	0,5% (p/v) azul de Coomassie R250; 50% (v/v) metanol e 7,5% (v/v) ácido acético.
Fenol equilibrado	fenol cristalino (fundido a 65°C), 0,1% 8-hidroxiquinoleína e um volume de Tris base 0,5 mmol/L. Após lenta agitação, a fase aquosa foi removida e a fase fenólica foi extraída com 0,1 mol/L Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,2% (v/v) $\beta$ -mercaptoetanol, até que a fase aquosa apresentasse pH $\geq$ 7,5.
Solução descorante para gel de proteína	45% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético.
Solução II (SDS-PAGE)	1,5 mol/L Tris-HCl pH 8,8 e 0,3% (p/v) SDS.
Solução III (SDS-PAGE)	0,5 mol/L Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% (p/v) SDS.

<sup>§</sup> - percentagem de acrilamida + bisacrilamida.

<sup>ε</sup> - percentagem de bisacrilamida.

TABELA 3.4 - COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

Continua

TAMPÕES	COMPOSIÇÃO
A	10 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 50 mmol/L NaCl e 1 mmol/L DTT.
Amostra - nativo (5x)	312,5 mmol/L Tris-HCl pH 6,8; 50% (v/v) glicerol e 0,05% (p/v) azul de bromofenol.
Amostra - ligação DNA-proteína (5x)	40 mmol/L Tris-acetato pH 7,5; 50% (v/v) glicerol e 0,01% (p/v) azul de bromofenol.
Amostra - ligação proteína-proteína (5x)	40 mmol/L Tris-acetato pH 7,5 e 50% (v/v) glicerol.
Amostra - SDS-PAGE (4x)	12 mmol/L Tris HCl pH6,8; 5% (v/v) glicerol; 0,4% (p/v) SDS; 2 mmol/L $\beta$ -mercaptoetanol e 0,02% (p/v) azul de bromofenol.
A <sub>NI</sub>	25 mmol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0; 5% (v/v) glicerol e 500 mmol/L NaCl.
ATPase (10x)	250 mmol/L Tris-acetato pH 7,5; 10 mmol/L DTT; 30 mmol/L glutamato de potássio; 0,1 mol/L acetato de magnésio e 50% (v/v) glicerol.
Cromatografia ascendente	0,75 mol/L Tris-HCl (pH 8) e 450 mmol/L NaCl.
D	250 mmol/L Tris HCl pH8,0; 25% (p/v) sacarose e 1 mmol/L de EDTA.
Laemmli (10x)	30 g Tris base; 140 g glicina e 10 g SDS (1 L).
Ligação ATP- proteína (4x)	80 mmol/L Tris-HCl (pH 7,5); 80 mmol/L cloreto de potássio e 40 mmol/L cloreto de magnésio.
Ligação DNA/proteína-proteína (10x)	400 mmol/L Tris-acetato pH7,5 e 10 mmol/L EDTA pH 8,0.
PCR (10x)	200 mmol/L Tris HCl pH8,4 e 500 mmol/L KCl.
PEG/NaCl	20% (v/v) PEG-8000 e 2,5 mol/L NaCl.
R	10 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 1 mmol/L DTT e 10% (v/v) glicerol.
Recombinação	25 mmol/L Tris-acetato pH 7,5; 1 mmol/L DTT; 5% (v/v) glicerol; 3 mmol/L glutamato de potássio e 10 mmol/L acetato de magnésio.
STA (10x)	250 mmol/L Tris-acetato pH 8,0; 100 mmol/L KCl; 80 mmol/L acetato de magnésio; 10 mmol/L DTT e 35% (v/v) PEG-8000.
TAE (50x)	2 mol/L Tris base; 57,1 mL ácido acético glacial e 50 mmol/L EDTA pH 8,0 (1 L), pH8,0.

		Conclusão
TAMPÕES	COMPOSIÇÃO	
TBE (10x)	0,89 mol/L Tris base; 0,89 mol/L ácido bórico e 20 mmol/L EDTA pH 8,0, pH8,0.	
TE	10 mmol/L de Tris HCl pH8,0 e 0,1 mmol/L de EDTA.	
TM (10x)	0,1 mol/L Tris-HCl, pH 8,0 e 0,1 mol/L MgCl <sub>2</sub> .	
Tris-Glicina (10x)	30,3 g/L Tris base e 150 g/L glicina, pH 8,6.	
Tris-HCl (1 mol/L)	121 g/L Tris base em água. O pH foi ajustado com HCl.	

### 3.1.3 Estirpes de bactérias e plasmídeos

As estirpes de *E. coli* e o bacteriófago utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.5. Os plasmídeos estão listados na Tabela 3.6.

TABELA 3.5 - ESTIRPES DE BACTÉRIAS HOSPEDEIRAS E DO BACTERÍÓFAGO USADOS NESTE TRABALHO.

ESTIRPES DE <i>E. coli</i>	GENÓTIPO	RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA
BL21(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>[r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>] gal dcm</i> (DE3) pLysS	-	Novagen
B834(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>[r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>] gal dcm met</i> (DE3)	-	Novagen
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqΔM15 Tn10</i> ]	Tc	Bullock <i>et al.</i> , 1987.
DH10B	φ80d <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK deoR λ<sup>-</sup> rpsL mupG</i>	Sm	Grant <i>et al.</i> , 1990.
7118	<i>supE thi Δ(lac-proAB) F' [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ ΔM15 ]</i>	-	Messing <i>et al.</i> , 1977.
BACTERÍÓFAGO	GENÓTIPO	RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA
M13K07	Derivado do M13, carrega o gene II com a substituição M40I, e a <i>ori</i> de p15A e o gene de resistência a canamicina inseridos na <i>ori</i> M13.	Km	Vieira & Messing, 1987.

TABELA 3.6 - PLASMÍDEOS USADOS NESTE TRABALHO.

Continua

PLASMÍDEOS	GENÓTIPO / FENÓTIPO RELEVANTES	REFERÊNCIA/FONTE
pAET	fragmento <i>NdeI/BamHI</i> de 1,1 kpb do pALHBT clonado no vetor pET28a, contém o gene <i>recA</i> de <i>H. seropedicae</i> ( <i>HsrecA</i> ) L54Q, Km <sup>R</sup>	Este trabalho
pAET-G73A	pAET mutagenizado, contém o gene <i>HsrecA</i> L54Q G73A clonado no vetor pET28a, Km <sup>R</sup>	Este trabalho
pAET-HMK	fragmento <i>NdeI/BamHI</i> de 1,1 kpb do pAET clonado no vetor pET28b+HMK, contém o gene <i>HsrecA</i> L54Q, Km <sup>R</sup>	Este trabalho
pAET-WT	pAET mutagenizado, contém o gene <i>HsrecA</i> clonado no vetor pET28a, Km <sup>R</sup>	Este trabalho
pAETWT-HMK	pAETWT::sequência HMK, contém o gene <i>HsrecA</i> , Km <sup>R</sup>	Este trabalho
pALHBT	Fragmento <i>NdeI/BamHI</i> de 1,1 kpb do pATOPO clonado no vetor pLHBT, contém o gene <i>HsrecA</i> , Cm <sup>R</sup>	Este trabalho
pATOPO	pCR4Blunt-TOPO::HsrecA, Amp <sup>R</sup>	Este trabalho
pAX	fragmento <i>NdeI</i> de 2,2 kpb do pBMR507 clonado no vetor pET28a, Km <sup>R</sup>	Este trabalho
pBMR503	fragmento <i>HindIII</i> de 3,65 kpb do pBMR5 clonado no vetor pTZ18R, contém o gene <i>HsrecA</i> , Amp <sup>R</sup>	Steffens <i>et al.</i> , 1993
pBMR507	fragmento <i>EcoRI</i> de 4,5 kpb clonado no vetor pTZ19R, contém os genes <i>recA</i> e <i>recX</i> de <i>H. seropedicae</i> , Amp <sup>R</sup>	Galvão <i>et al.</i> , 2003
pBT	Vetor de expressão, promotor <i>lac</i> , gera proteína de fusão com o repressor do fago $\lambda$ cl, Cm <sup>R</sup>	Bacteriomatch
pCR4-TOPO	vetor de clonagem, <i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup> e Km <sup>R</sup>	Invitrogen
pCWG3	fragmento <i>NdeI/EcoRI</i> de 0,8 kpb do pBMR507 clonado no vetor pET28a, contém o gene <i>recX</i> de <i>H. seropedicae</i> ( <i>HsrecX</i> ), Km <sup>R</sup>	Este trabalho
pCWG5	fragmento <i>KpnI/BamHI</i> de 1,1 kpb do pBMR507 clonado no vetor pTZ18R, contém o gene <i>HsrecA</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabalho
pCWG7	fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> de 1,1 kpb do pCWG5 clonado no vetor pT7-7, contém o gene <i>HsrecA</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabalho
pCWG8	fragmento <i>NdeI/BamHI</i> de 1,1 kpb do pCWG7 clonado no vetor pET28a, contém o gene <i>HsrecA</i> , Km <sup>R</sup>	Este trabalho



		Conclusão
PLASMÍDEOS	GENÓTIPO / FENÓTIPO RELEVANTES	REFERÊNCIA/FONTE
pCWG9	pCWG8 contendo o fragmento <i>NdeI/XbaI</i> deletado, contém o gene <i>HsrecA</i> , Km <sup>R</sup>	Este trabalho
pET28a	vetor de expressão (promotor T7), gera proteína de fusão com His, Km <sup>R</sup>	Novagen
pET28b+HMK	vetor de expressão (promotor T7), gera proteína de fusão com His e sítio de fosforilação para a proteína HMK ( <i>bovine heart muscle kinase</i> ), Km <sup>R</sup>	Bordes, P.
pLHBT	fragmento <i>NotI/EcoRI</i> contendo (Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>2</sub> e um sítio para <i>NdeI</i> clonado no vetor pBT, Cm <sup>R</sup>	Huergo, L. F.
pT7-7	vetor de expressão (promotor T7), Amp <sup>R</sup>	N. E. Biolabs
pTRG	vetor de expressão, promotor <i>lac</i> , gera proteína de fusão com a subunidade alfa da RNA polimerase, Tc <sup>R</sup>	Bacteriomatch
pTZ18R/19R	vetor de clonagem, <i>lacZ</i> fl IG, Amp <sup>R</sup>	Mead <i>et al.</i> , 1986
pXT7	fragmento <i>BamHI/XhoI</i> de 0,8 kpb do pXTRG2 clonado no vetor pT7-7, contém o gene <i>HsrecX</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabalho
pXTRG2	fragmento <i>BamHI/EcoRI</i> de 0,8 kpb do pCWG3 clonado no vetor pTRG, contém o gene <i>HsrecX</i> , Tc <sup>R</sup>	Este trabalho

### 3.1.4 DNA

O DNA simples-fita (ssDNA) circular do bacteriófago  $\phi$ X174 e o DNA dupla-fita (dsDNA) circular super-helicoidal  $\phi$ X174 foram adquiridos da New England Biolabs. O dsDNA linear foi gerado pela digestão com a endonuclease de restrição *XhoI*, seguindo instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada pela absorbância em 260 nm empregando a seguinte relação: D.O.<sub>260</sub> = 1,0 corresponde a uma concentração de 50  $\mu$ g/mL de dsDNA ou 37  $\mu$ g/mL de ssDNA (Sambrook *et al.*, 1989). A concentração de DNA foi expressa em  $\mu$ mol/L de nucleotídeos ou pares de nucleotídeos para ssDNA ou dsDNA, respectivamente.

### 3.1.5 Reagentes e proteínas

Enzimas de restrição e modificadoras de DNA, RNase, tampões e sais utilizados para preparar as soluções utilizadas na manipulação do DNA foram todas de alto grau de pureza (grau biologia molecular) obtidos de diferentes fornecedores (Sigma Chemical Company, Merck, GE Healthcare, Invitrogen, New England Biolabs). A proteína ligadora de ssDNA (*single-stranded binding protein* - SSB) foi adquirida da USB (Cleveland, Ohio, USA). A proteína RecA de *E. coli* e os nucleotídeos radioativos foram adquiridos da GE Healthcare. A proteína DraG com cauda N-terminal contendo 6 resíduos de histidinas (His) purificada foi gentilmente cedida na concentração de 28  $\mu\text{mol/L}$  (considerando monômero) por Luciano F. Huergo.  $\beta$ -D-isopropil tiogalactosídeo (IPTG) e dNTPs foram adquiridos da Eppendorf. Etanol, clorofórmio, metanol, isopropanol, ácido acético glacial, álcool isoamílico foram adquiridos da Merck. Os antibióticos foram adquiridos da Sigma, exceto a ampicilina a qual foi adquirida da União Química. Como padrão de massa molecular para DNA foi utilizado o “1 kb ladder” adquirido da Invitrogen. Como padrões de massa molecular para proteína foram utilizados BenchMarker, BenchMarker pré-corado (Invitrogen) ou LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare). Reagentes para preparo de meios de cultura foram adquiridos da USB. Terrific broth, glucose, glicerol, agarose e glicina foram adquiridos da Invitrogen. Poliacrilamida e bis-acrilamida foram adquiridos da Sigma. O gás nitrogênio foi adquirido da White Martins S.A.

### 3.2 Métodos Gerais para DNA

A velocidade de centrifugação, quando não mencionada, foi de 13.400xg. Neste trabalho foi denominada água Milli-Q a água que foi destilada e filtrada através de uma matriz de carvão ativo e de resinas de troca iônica no aparelho Milli-Q Plus (Millipore) e posteriormente esterilizada.

### 3.2.1 Manipulação do DNA

As reações de ligação e restrição foram realizadas como sugerido pelo fabricante ou como descrito por Sambrook *et al.* (1989).

O isolamento de plasmídeos de *E. coli* em grande ou pequena escala foi feito após cultivo da bactéria contendo o plasmídeo de interesse em meio LB ou TB a 37°C e 130 rpm por um período de até 16 horas. Visando garantir uma aeração ideal, foi empregada a relação de 1:5 entre o volume do meio e o volume total do frasco empregado. O isolamento dos plasmídeos foi feito utilizando kit QIAprep miniprep system (Qiagen Inc.), kit Flexprep (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante, ou através do método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.2.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose ou ágar

As eletroforeses em gel de agarose ou ágar foram realizadas como descrito por Sambrook *et al.* (1989). As soluções tampão utilizadas foram TBE 1x ou TAE 1x. A concentração dos géis variou de 0,5 - 1,5 % (p/v). As amostras de DNA foram misturadas com corante F. E. FSUDS (5x).

As corridas eletroforéticas foram feitas a 12-50 V por 2-15 horas. Após eletroforese, para a visualização das bandas de DNA, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 20-40 minutos e o excesso de corante foi retirado com água destilada. O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC<sup>3</sup> System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA USA). O registro das imagens foi feito em papel térmico Sony (Video printer Grafic UP860CE).

### 3.2.3 Transformação bacteriana por Eletroporação

**Preparo de células eletrocompetentes:** O pré-inóculo foi preparado a partir da inoculação de uma colônia de células de *E. coli* em 5 mL de meio SOB. O cultivo foi realizado a 37°C e 130 rpm até a saturação da cultura. Quinhentos microlitros desta cultura foram utilizados como inóculo em 100 mL de meio SOB. As células foram cultivadas a 37°C e 130 rpm até atingir a D.O.<sub>600</sub> entre 0,6-0,8. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos plásticos de 40mL e centrifugada a 5.000xg a 4°C por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes, com 40 mL de água Milli-Q estéril gelada (4°C). Após as lavagens, o sedimento foi ressuspensão em 30 mL de glicerol 15% e centrifugado (5.000xg a 4°C por 10 minutos). Após o descarte do sobrenadante, o sedimento de células foi ressuspensão na solução de glicerol remanescente nas paredes do tubo (cerca de 1 mL), a suspensão de células foi aliquoteada (30 µL) e armazenada a -80°C.

**Eletroporação:** Aliquotas de 30 µL de células eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo e utilizadas para eletroporação. Em cada tubo foi adicionado 0,8 - 2 µL de DNA plasmidial ou reação de ligação. Após a leve homogeneização da mistura, essa foi transferida para uma câmara de eletroporação e submetida a um pulso elétrico de 4 kV, 200Ω, 330 µF no aparelho Cell Porator (Life Technologies). A seguir, as células foram transferidas para frascos de 25 mL contendo 1 mL de meio SOC e incubadas a 37°C a 130 rpm, por 1 hora. Aliquotas de 100-400 µL de células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados para a seleção das células transformantes. As placas foram incubadas a 37°C durante 16-24 horas. As colônias de *E. coli* foram coletadas, os plasmídeos isolados (seção 3.2.1) e analisados.

### 3.2.4 Amplificação do DNA

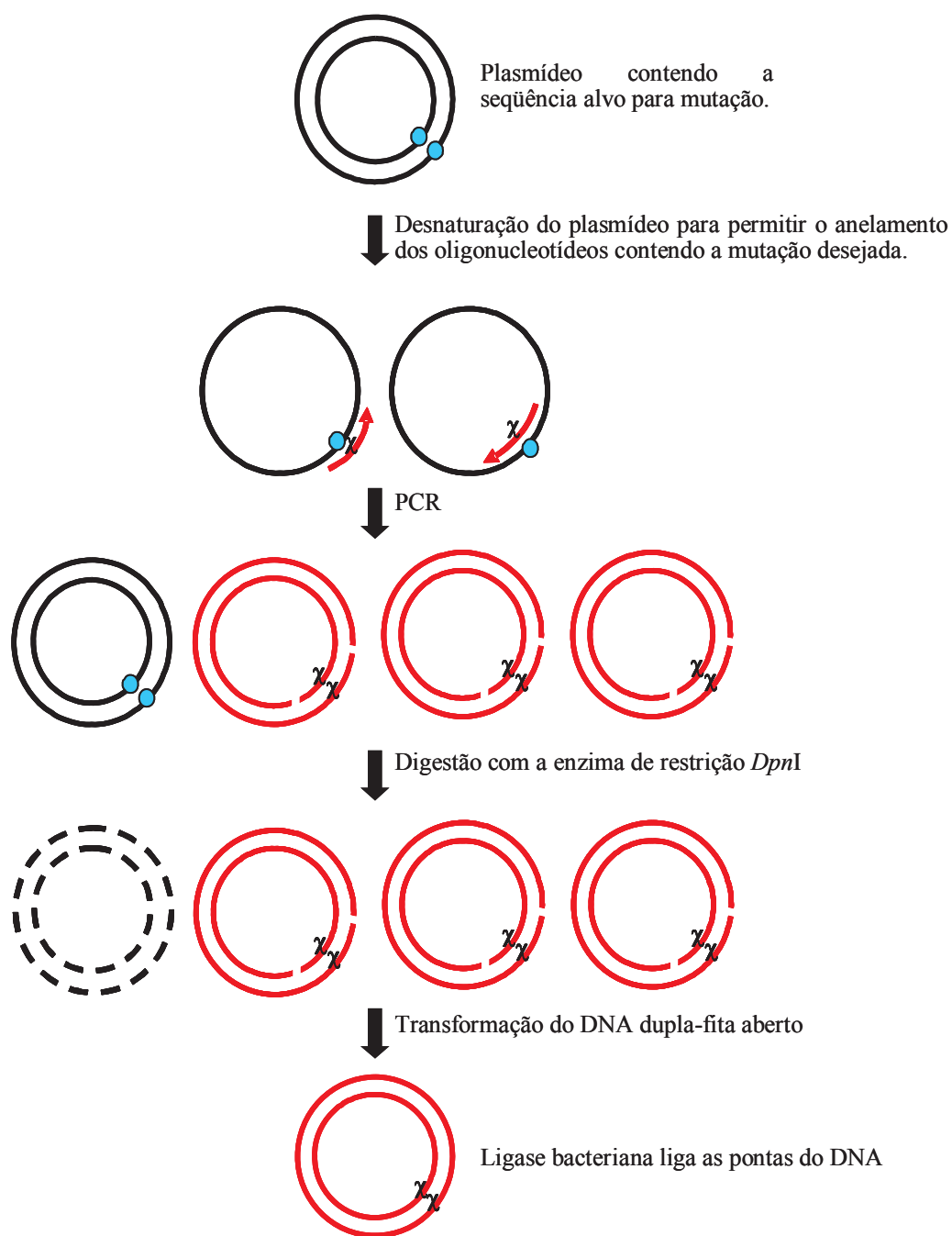
O sistema de reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizado consistiu de 5 µL de tampão da polimerase *Taq* (10x), cerca de 20 ng de DNA molde, 200 pmol dNTPs, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL de DMSO, 5U *Taq* DNA polimerase (purificada no Laboratório de Fixação de Nitrogênio) e água Milli-Q para um volume final de 50 µL. Os programas utilizados para amplificação consistiram de: 30 ciclos de desnaturação (95°C), anelamento (temperatura definida por cada par de oligonucleotídeos) e extensão (72°C). A temperatura de anelamento foi calculada considerando que cada par AT contribui em 2°C para a temperatura de fusão do DNA dupla-fita e o par GC, em 4°C. Para cada pareamento incorreto entre o oligonucleotídeo e a fita molde foi diminuído 5°C da temperatura calculada. Para garantir a desnaturação do DNA molde, antes da execução do programa, o sistema de PCR foi submetido a uma etapa a 95°C por 5 minutos e para garantir a completa extensão do DNA sintetizado foi acrescentada uma etapa a 72°C por 10 minutos ao final do programa.

Os produtos de PCR foram purificados por extração com 1 volume de fenol equilibrado:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após centrifugação, a fase aquosa contendo o material amplificado foi coletada e transferida para um novo tubo. A precipitação do DNA foi feita pela adição de 2 volumes de etanol 95% seguida de incubação à temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos e centrifugação por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado com 1 mL de etanol 80%. Em seguida o material foi centrifugado por 7 minutos. O etanol foi retirado por sucção e o material foi seco em bomba de vácuo. O precipitado foi dissolvido em 10 - 50 µL de água Milli-Q.

### 3.2.5 Mutagênese sítio-dirigida

A mutagênese sítio-dirigida foi feita utilizando o Kit QuikChange<sup>TM</sup> Site Directed Mutagenesis (Stratagene). Esta metodologia emprega duas enzimas, (1) a DNA polimerase *PfuI* de *Pyrococcus furiosus*, enzima de alta fidelidade e processividade e (2) a enzima de restrição *DpnI*, a qual digere essencialmente DNA semi-metilado e metilado que contém a sequência alvo 5'-GmGATC-3'. Usando DNA plasmidial como molde e dois oligonucleotídeos sintéticos complementares contendo a mutação desejada, a DNA polimerase *PfuI* replica integralmente ambas as fitas do plasmídeo numa reação de PCR. A enzima *DpnI*, adicionada à mistura de reação após a amplificação, digere o DNA molde, mas não o DNA sintetizado que contém a mutação (Figura 3.1).

Os plasmídeos utilizados como molde (parentais) foram preparados como descrito na seção 3.2.1. Num sistema de reação de 50 µL foram adicionados 50 ng do DNA molde, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 pmol dNTPs, 5µL de tampão da polimerase *PfuI* (10x) e 2,5U de *PfuI*. A reação de amplificação consistiu dos seguintes passos: 1 ciclo : 95°C - 1 min e 16 ciclos 95°C - 30 s, 55°C - 1 min e 68°C - 12 min. O produto de PCR foi purificado utilizando-se o kit Qiaquick PCR purification (Qiagen Inc.) para remover a DNA polimerase, e posteriormente foi tratado com 10U da enzima de restrição *DpnI*. Após a incubação a 37°C por 1 hora, 2 µL da mistura de reação foram usados para transformar células de *E. coli*. Plasmídeos purificados a partir de colônias isoladas foram seqüenciados para confirmação da presença da mutação desejada e confirmar a integridade do restante do gene.

FIGURA 3.1 - ESQUEMA DA MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA *QUICKCHANGE*.

O círculo em azul representa o sítio a ser mutado. Os oligonucleotídeos mutagênicos (setas vermelhas) apresentam um ou mais sítios da mutação ( $\chi$ ). O apêndice A contém a sequência dos oligonucleotídeos utilizados.



### 3.2.6 Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento foi utilizado o método de terminador marcado (*dye terminator*) utilizando ddNTPs marcados com fluoróforos e a DNA polimerase termoestável (Sanger *et al.*, 1977; Reeve & Fuller, 1995).

#### 3.2.6.1 Reação de sequenciamento de DNA

O sistema de reação (10  $\mu$ L) continha 0,1 - 0,2  $\mu$ g do DNA plasmidial purificado (seção 3.2.1), 10 pmol do oligonucleotídeo iniciador (Apêndice A) e 4,0  $\mu$ L de reagente de sequenciamento DYEnamic ET (GE Healthcare). A reação foi submetida ao seguinte programa no termociclador: 1 ciclo de 5 min a 95°C e 30 ciclos de 20 s a 96°C, seguido de 90 s a 60°C.

#### 3.2.6.2 Purificação do produto da reação de sequenciamento

Após a realização da reação de sequenciamento, o sistema de reação foi transferido para um tubo de 500  $\mu$ L no qual foram adicionados também 20  $\mu$ L de água Milli-Q e 60  $\mu$ L de isopropanol. O sistema foi incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugado durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 250  $\mu$ L de etanol 80%. Após a centrifugação por 8 minutos e descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco em bomba de vácuo. O DNA foi dissolvido em formamida deionizada-blue dextran:EDTA, aquecido a 94°C por 2 minutos e aplicado no sequenciador Automático ABI377 (Applied Biosystems).

#### 3.2.6.3 Edição e Análise das seqüências

As seqüências de DNA obtidas foram alinhadas e editadas utilizando o programa Bioedit (Hall, 1999). O programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) foi utilizado para o alinhamento da seqüência de aminoácidos das proteínas RecA selvagem com RecA mutantes e para o alinhamento das proteínas RecA e RecX de *H.*

*seropedicae* com aquelas de outros organismos. Todas as seqüências obtidas foram submetidas ao programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Altschul *et al.*, 1997) e comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados GenBank.

### 3.2.7 Purificação de DNA simples-fita

Células de *E. coli* 7118 ao serem transformadas com o plasmídeo vetor pTZ19R e infectadas pelo bacteriófago M13K07 replicam o plasmídeo na forma de ssDNA a partir da origem de replicação *f1* do fago M13 presente no vetor. O DNA é posteriormente empacotado em capsídeos virais que vão para o meio de cultura sem induzir a lise da célula hospedeira.

**Infecção bacteriana:** O ssDNA foi obtido como descrito por Sambrook *et al.* (1989). Uma colônia da estirpe de *E. coli* 7118 contendo o vetor pTZ19R foi cultivada em 2 mL de meio TB contendo ampicilina em frasco de 10 mL durante 12 horas. Dez microlitros dessa cultura foram inoculados em 2,5 mL de meio TB contendo ampicilina em frasco de 25 mL e cultivadas até atingirem a D.O.<sub>600</sub> de 0,2-0,4. Neste momento, o fago M13K07 ( $10^{11}$  -  $10^{12}$  pfu/mL) foi adicionado à cultura numa concentração 10 vezes maior do que a das células bacterianas ( $10^7$  células/mL). Após 2 horas de incubação, 100 µL da cultura infectada foram inoculados em 2,5 mL de meio TB contendo ampicilina e canamicina (20 µg/mL) em frasco de 25 mL e incubados sob agitação durante a noite.

**Isolamento do ssDNA:** Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi centrifugada em tubo plástico de 1,5 mL durante 5 minutos. Cerca de 1,2-1,3 mL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo contendo 200 µL de tampão PEG/NaCl (Tabela 3.4), misturados por inversão e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e novamente centrifugada por 6 minutos para remoção de sobrenadante residual. O precipitado contendo os bacteriófagos foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE e a lise dos capsídeos virais foi obtida por extração com 0,5 volumes de fenol equilibrado, com agitação no vórtex por cerca de 30 s intercalada com 1 minuto sem agitação (3 vezes). A mistura foi centrifugada por 5 minutos e 80µL da fase aquosa foi transferida para

um novo tubo de 1,5 mL. O sobrenadante foi precipitado com 225 µL de etanol absoluto e 9 µL de acetato de sódio 3 mol/L após incubação de 5 a 10 minutos a -70°C. O DNA foi coletado após centrifugação por 10-15 minutos, lavado com etanol 80%, seco em bomba de vácuo e dissolvido em 20-40 µL de água Milli-Q.

### 3.2.8 Clonagem

#### 3.2.8.1 Clonagem do gene *recA* de *H. seropedicae*

A estratégia inicial adotada para a sub-clonagem do gene *recA* de *H. seropedicae* foi a amplificação do gene a partir do plasmídeo pBMR503 utilizando o oligonucleotídeo *recA2* (contém a sequência complementar ao final do gene *recA* e ainda o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Bam*HI - Apêndice A), e o oligonucleotídeo reverso (complementar ao vetor - Apêndice A). O fragmento de DNA amplificado foi digerido com *Kpn*I/*Bam*HI e clonado no vetor pTZ18R digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pCWG5. *Kpn*I foi utilizada uma vez que a montante do códon de início de tradução do gene *recA* há um sítio de reconhecimento para essa enzima de restrição. Após a clivagem do plasmídeo pCWG5 com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Bam*HI, o gene *recA* foi clonado no vetor pT7-7, gerando o plasmídeo pCWG7. Esse plasmídeo, por sua vez, foi digerido com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI, para a clonagem do gene *recA* no vetor pET28a, gerando o plasmídeo pCWG8.

A superexpressão da proteína RecA nativa e RecAHis a partir dos plasmídeos pCWG7 e pCWG8 indicou que a proteína RecA estava sendo traduzida tanto utilizando a sequência de ligação do ribossomo (RBS) do vetor quanto o RBS do gene *recA*. Para a retirada de um dos sítios RBS, o plasmídeo pCWG8 foi clivado com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xba*I, tratado com a enzima Klenow e dNTPs e então com a enzima T4 DNA ligase para recircularizar o plasmídeo. O produto de reação foi transformado em *E. coli*, obtendo-se o plasmídeo recombinante pCWG9, que codifica a proteína RecA nativa.

Para a obtenção de uma construção que expressasse a proteína RecAHis, o oligonucleotídeo recA1 (contém a sequência complementar ao início do gene *recA* e ainda o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *NdeI* - Apêndice A) foi sintetizado e juntamente com o oligonucleotídeo recA2 foram utilizados numa reação de PCR empregando o plasmídeo pBMR503 como DNA molde. O produto de amplificação de aproximadamente 1,1 kpb foi clonado no vetor pCR4-TOPO, originando o plasmídeo pATOPO. Posteriormente, pATOPO foi digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e ligado ao vetor pET28a, originando o plasmídeo pAET. O sequenciamento deste plasmídeo utilizando os oligonucleotídeos T7 e T7 terminador (oligonucleotídeos complementares às regiões que flanqueiam o sítio de policlonagem do vetor pET28a - Apêndice A) revelou a troca do resíduo de timina 161 por adenina causando a mudança do resíduo 54 de leucina para glutamina. (Apêndice B). Assim, o plasmídeo pAET codifica para uma proteína RecAHis mutante contendo a substituição L54Q.

Para obter um plasmídeo com a sequência codificando para a proteína RecA na sua forma selvagem, oligonucleotídeos Q54L e Q54L\* (Apêndice A) foram utilizados na troca do nucleotídeo mutagenizado como descrito na seção 3.2.5. O plasmídeo contendo o gene *recA* selvagem foi denominado pAETWT e codifica a proteína RecAHis selvagem.

Para a inserção da sequência de aminoácidos reconhecida e fosforilada pela quinase de músculo cardíaco de boi (*bovine heart muscle kinase* ou HMK) a montante da sequência que codifica para RecA L54Q, o fragmento *NdeI/BamHI* do plasmídeo pAET foi clonado no vetor pET28b+HMK (Apêndice C) gerando o plasmídeo denominado pAET-HMK. Esse plasmídeo também codifica para uma proteína RecAHis mutante contendo a substituição L54Q. Para a inserção da sequência que codifica HMK a jusante da proteína RecA selvagem, foi adotada outra estratégia. Os oligonucleotídeos HMK e HMK\* (Apêndice A e C) foram utilizados numa PCR mutagênica sítio-dirigida tendo como DNA molde o plasmídeo pAETWT, gerando o plasmídeo pAETWT-HMK. Esse plasmídeo também codifica a proteína RecAHis.

Ambas as proteínas que apresentam a sequência HMK e podem ser marcadas com [ $^{32}\text{P}$ ] utilizando quinase HMK e [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP.

O códon que codifica para o resíduo de glicina 73 da proteína RecA de *H. seropedicae*, essencial para a ligação de ATP (Konola *et al.*, 1994) foi substituído pelo códon que codifica para alanina (GGC para GCC) por PCR mutagênica. Para obtenção deste mutante, o plasmídeo pAET foi usado como DNA molde numa PCR mutagênica sítio-dirigida utilizando os oligonucleotídeos G73A e G73A\* (Apêndice A). O plasmídeo que codifica para a proteína RecA mutante L54Q G73A foi denominado pAET-G73A.

### 3.2.8.2 Clonagem do gene *recX* de *Herbaspirillum seropedicae*

Para a amplificação do gene *recX* de *H. seropedicae*, foram utilizados os oligonucleotídeos *recX1* (complementar ao início do gene *recX* e contém o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *NdeI*) e universal (complementar ao vetor pTZ19R - Apêndice A) e, como molde, o plasmídeo pBMR507. O produto amplificado de 0,8 kpb foi clonado como fragmento *NdeI/EcoRI* no vetor pET28a, originando o plasmídeo pCWG3. Esse plasmídeo codifica a proteína RecXHis. A identificação de mais um sítio *NdeI* a jusante do códon de parada da tradução dificultou a clonagem direta do gene *recX* do plasmídeo pCWG3 no vetor pT7-7, para obter a proteína RecX nativa. Dessa forma, o gene *recX* foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos *recX2* (complementar ao início do gene *recX* e contém o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *BamHI*) e T7 terminador (complementar ao vetor pET28a - Apêndice A) e, como molde, o plasmídeo pCWG3. O produto amplificado de 0,8 kpb foi clonado como fragmento *BamHI/EcoRI* num vetor intermediário o pTRG, originando o plasmídeo pXTRG2. Este plasmídeo foi clivado com as enzimas *BamHI/XhoI* e o fragmento clonado no vetor pT7-7 *BamHI/SalI*, originando o plasmídeo pXT7. Esse plasmídeo codifica para a proteína RecX nativa.

### 3.3 Métodos Gerais para proteína

#### 3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante

A eletroforese em gel de poliacrilamida que utiliza o SDS como agente desnaturante de proteína é denominada SDS-PAGE (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*). A desnaturação é promovida pela ligação do SDS à proteína formando um complexo proteína-SDS de carga negativa. O número de moléculas de SDS ligado à proteína é proporcional ao seu tamanho.

As análises eletroforéticas de proteínas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante foram feitas como descrito por Laemmli (1970) usando sistema de minigéis Höefer ou BioRad. A percentagem de acrilamida no gel de separação dependeu da massa molecular das proteínas que estavam sendo analisadas. A Tabela 3.7 contém a composição dos géis utilizados nas análises por SDS-PAGE realizadas neste trabalho.

TABELA 3.7 - COMPOSIÇÃO DOS GÉIS DE SEPARAÇÃO E DE EMPILHAMENTO UTILIZADOS NAS ANÁLISES POR SDS-PAGE.

COMPONENTES	GEL DE SEPARAÇÃO		GEL DE EMPILHAMENTO
	12,5%	15%	
Solução II (SDS-PAGE)	2,5 mL	2,5 mL	-
Solução III (SDS-PAGE)	-	-	1 mL
Água	3,4 mL	2,5 mL	2,4 mL
Acrilamida (30% T, 2,67% C)	4,1 mL	5,0 mL	0,6 mL
10% (p/v) APS	100 µL	100 µL	40 µL
TEMED	10 µL	10 µL	4 µL
Volume final	10 mL	10 mL	4 mL

As amostras, antes de serem analisadas por SDS-PAGE, foram misturadas com tampão de amostra - SDS-PAGE (Tabela 3.4) e aquecidas a 95°C por 3 minutos. As eletroforeses foram realizadas a 150-200V em tampão Laemmli (1x) durante 40-50 minutos,

ou até o azul do bromofenol atingir 1 cm da borda inferior do gel. O gel foi corado com solução de azul de Coomassie e descorado com solução descorante para gel de proteína.

### 3.3.2 Superexpressão das proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae*

Aproximadamente 50 colônias de *E. coli* B834 (DE3) ou BL21 (DE3) pLysS, contendo o plasmídeo de interesse, crescidas no dia anterior em meio LA, foram inoculadas em 1 L de meio TB suplementado com antibiótico adequado. As células foram cultivadas a 37°C e 130 rpm, durante 2-3 horas ou até atingirem a D.O.<sub>600</sub> de 0,3. Posteriormente, o frasco foi transferido para a temperatura de 25°C, seguido de 30 minutos de incubação antes da adição de 1 mmol/L de IPTG. A cultura foi incubada por mais 3-4 horas na mesma temperatura. As células foram coletadas por centrifugação (5.000xg, 4°C por 10 minutos), o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi estocado a -20°C até o momento da purificação. Um mililitro da amostra foi coletado separadamente para análise por SDS-PAGE (seção 3.3.1), para confirmar a superexpressão da proteína de interesse.

O precipitado de células transformadas com o plasmídeo pCWG3, pAET-HMK, pAETWT-HMK ou pAET-G73A foi ressuspenso em aproximadamente 50 mL de tampão A<sub>NI</sub> contendo um tablete de inibidores de protease (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche Applied Science). O rompimento das células foi induzido pela mudança brusca de pressão: de 1,7 atm para 1 atm, em disruptor de células (Constant Systems Ltd, UK). O sedimento de células transformadas com o plasmídeo pCWG9 e pXT7 foi ressuspenso em aproximadamente 20 mL de tampão D contendo fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) 1 mmol/L ou 25 mL de tampão A contendo glicerol 10% e PMSF 1 mmol/L, respectivamente. As células foram rompidas por sonicação (6 vezes de 20 segundos em gelo) em um sonicador Heat System equipado com microponta. Os lisados de células foram então centrifugados a 18.000xg por 30 minutos a 4°C.



### 3.3.3 Purificação das proteínas

Todas as proteínas utilizadas nos ensaios *in vitro* foram purificadas usando o equipamento FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography - cromatografia líquida de performance rápida; GE Healthcare). O grau de pureza das proteínas foi determinado densitometricamente a partir de géis SDS-PAGE corados com solução de azul de Coomassie.

#### 3.3.3.1 Purificação de proteína contendo cauda His

##### 3.3.3.1.1 Cromatografia de afinidade utilizando metal imobilizado

A resina utilizada nessa cromatografia de afinidade é formada por uma matriz de agarose ligada covalentemente a um quelante de cátions divalentes, como o ácido iminodiacético. O aminoácido histidina tem a capacidade de complexar muitos íons metálicos de transição. A coluna carregada com íons metálicos adequados, níquel por exemplo, retém seletivamente as proteínas que apresentem pelo menos duas histidinas adjacentes e expostas à superfície da molécula. Estas proteínas ligadas à resina podem ser eluídas através de um gradiente de imidazol. O imidazol complexa o metal de transição ligado à resina, deslocando a proteína.

A coluna Hi-Trap Chelating Ni<sup>2+</sup> - 5 mL (GE Healthcare) foi preparada como descrito a seguir. A coluna foi lavada e carregada com íons Ni<sup>2+</sup> seguindo-se a ordem. a) 10 volumes de coluna (10VC) de água Milli-Q, b) 2VC de acetato de amônio pH 4,0 (100 mmol/L), c) 2VC de NiCl<sub>2</sub> (100 mmol/L) diluído em acetato de amônio pH 4,0 (100 mmol/L) e finalmente d) 2VC de acetato de amônio pH 4,0 (100 mmol/L) para remover o níquel não ligado. A coluna foi então conectada ao FPLC e equilibrada com tampão A<sub>NI</sub> (10 VC), tampão B<sub>NI</sub> (5VC) e novamente com tampão A<sub>NI</sub> (10VC). A fração sobrenadante do extrato celular (200-800 mg de proteína total diluída em 25-50 mL) foi aplicado à coluna e posteriormente foi feita a lavagem da coluna com 0,04 mol/L de imidazol em tampão A<sub>NI</sub> (10VC). As proteínas foram eluídas com 40 mL (8VC) de gradiente de imidazol (0,04 a 0,72 mol/L) em tampão A<sub>NI</sub>. A velocidade de fluxo foi mantida em 2 mL/minutos até o início do gradiente de imidazol, quando o

fluxo foi reduzido para 1 mL/minutos. As frações coletadas, de 4 mL, foram analisadas por SDS-PAGE (seção 3.3.1). As frações mais puras foram dialisadas por 15 h contra tampão A contendo glicerol 50% (2x 500 mL), com a troca sendo feita após 4 horas do início da diálise.

### 3.3.3.2 Purificação de proteína nativa

#### 3.3.3.2.1 Precipitação da proteína RecA com Polietilenoimina e Sulfato de Amônio

Tanto a polietilenoimina quanto o sulfato de amônio induzem a precipitação seletiva das proteínas. A polietilenoimina é um polímero positivamente carregado  $((\text{NHCH}_2\text{CH}_2)_x[-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2-]_y)$  que ao interagir com proteínas ácidas ou com DNA induz a precipitação de ambos. A polietilenoimina ao interagir com o DNA também induz a precipitação de proteínas ligadas ao DNA. O sulfato de amônio induz a precipitação das proteínas por *salting out*. Uma vez que a concentração de sulfato de amônio requerida para induzir a precipitação das proteínas é variável, esse sal é comumente usado na primeira etapa da purificação para retirar as proteínas que precipitam em concentrações diferentes da proteína de interesse e ainda para concentrá-la (Scopes, 1987).

À fração solúvel do extrato celular foi adicionado polietilenoimina 0,5% (v/v), a partir de uma solução estoque aquosa 50%. Após a agitação por 30 minutos-1 hora a 4°C, a amostra foi centrifugada a 12.000xg por 15 minutos e o precipitado ressuspense em tampão R contendo 50 mmol/L sulfato de amônio (1,2% de saturação, S = 1,2%). Após a agitação por 10 minutos-1 hora à 4°C, a amostra foi centrifugada a 12.000xg por 15 minutos e o precipitado ressuspense em tampão R contendo sulfato de amônio 200 mmol/L (S = 5%). A amostra foi centrifugada a 27.000xg por 30 minutos, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foram adicionados 0,2 g/mL de sulfato de amônio (S = 34%). Após centrifugação a 27.000xg por 30 minutos, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foram adicionados 0,145 g/mL de sulfato de amônio, aumentando a saturação para 54%. Após centrifugação a 27.000xg por 30 minutos, o precipitado foi lavado com tampão R contendo 0,377 g/mL de sulfato de amônio (S =

58%) e novamente centrifugado a 27.000xg por 30 minutos. O precipitado obtido nessa etapa foi dissolvido em tampão R contendo 200 mmol/L de sulfato de amônio (S = 5%) e dialisado contra tampão A contendo glicerol 10% (2 x 300mL), sendo que a troca foi feita após 4 horas do início da diálise, num total de 15 h.

#### 3.3.3.2.2 Cromatografia em DEAE-Sepharose

A coluna DEAE-Sepharose apresenta uma matriz de agarose ligada a grupos dietilaminoetil ( $-O-CH_2CH_2-N^+(C_2H_5)_3H$ ). Esses grupos agem como trocadores fracos de ânions, uma vez que a ligação das proteínas negativamente carregadas a essa matriz é fraca. A eluição foi feita em presença de sal. O íon  $Cl^-$  retira a molécula alvo do grupo amino imobilizado e, simultaneamente, o íon  $Na^+$  se liga à molécula alvo, favorecendo a eluição da mesma.

Após a primeira etapa de purificação, realizada a partir da precipitação seletiva na presença de polietilenoimina e sulfato de amônio, a proteína de interesse foi aplicada em coluna DEAE Sepharose (28 mL, 1,6 x 21 cm, GE Healthcare) empacotada e acoplada ao sistema FPLC (GE Healthcare), num fluxo de 1 mL/minutos. A coluna havia sido previamente equilibrada com tampão A contendo glicerol 10% (2VC). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão A contendo glicerol 10% (3VC), num fluxo de 2 mL/minutos. A eluição da proteína RecA nativa foi feita em 3VC, num gradiente crescente de NaCl (0,05 – 1 mol/L) em tampão A contendo glicerol 10%, num fluxo de 2 mL/minutos. As frações de 2 mL eluídas durante o gradiente de sal foram coletadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE (seção 3.3.1). As frações eluídas que apresentavam composição protéica semelhante entre si e continham a proteína de interesse foram agrupadas e dialisadas contra tampão A contendo glicerol 50% (2x 500 mL), sendo que a troca foi feita após 4 horas do início da diálise, num total de 15 h.

### 3.3.3.3 Cromatografia em SP-sepharose

A coluna SP-sepharose apresenta uma matriz de agarose ligada a grupos sulfopropil ( $-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CH_2CH_2SO^{-3}$ ). Esses grupos agem como trocadores fortes de cátion, uma vez que a ligação das proteínas positivamente carregadas a essa matriz é bastante forte. A eluição foi feita pela variação na concentração de sal. O íon  $Na^{+}$  retira a molécula alvo do grupo sulfopropil imobilizado e, simultaneamente, o íon  $Cl^{-}$  se liga à molécula alvo, favorecendo a eluição da mesma.

A fração solúvel do extrato celular foi aplicada, num fluxo de 1 mL/minutos, em uma coluna SP-sepharose (50 mL 1,6x 25,5 cm, GE Healthcare) empacotada e acoplada ao sistema FPLC (GE Healthcare). A coluna havia sido previamente equilibrada com tampão A contendo glicerol 10%, num fluxo de 2 mL/minutos. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 3,5VC de tampão A contendo glicerol 10%, num fluxo de 2 mL/minutos. A eluição da proteína RecX nativa foi feita com 4VC de gradiente contínuo de NaCl (0,05 – 1 mol/L) em tampão A contendo glicerol 10%, num fluxo de 2 mL/minutos. As frações de 5 mL eluídas durante o gradiente de sal foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE (seção 3.3.1). As frações eluídas que apresentavam composição protéica semelhante entre si e continham a proteína de interesse foram agrupadas e dialisadas contra tampão A contendo glicerol 50% (2x 500 mL), sendo que a troca foi feita após 4 horas do início da diálise, num total de 15 h.

### 3.3.4 Clivagem da proteína RecXHis com trombina

A trombina é uma protease específica que reconhece a sequência de aminoácidos LVPRGS e cliva a ligação peptídica entre os resíduos R e G. As proteínas expressas a partir do vetor pET28a contêm entre a cauda His e a primeira metionina a sequência reconhecida pela trombina. O tratamento da proteína His purificada com trombina gera uma proteína nativa (contém apenas os aminoácidos GSH além dos aminoácidos que constituem parte da proteína). A trombina utilizada nesse tratamento estava covalentemente ligada à biotina (trombina biotinilada), sendo assim, após a clivagem da cauda His, a enzima foi removida pela adição da resina de agarose

contendo a proteína streptavidina imobilizada. A cauda His clivada foi removida pela adição da resina de agarose contendo  $\text{Ni}^{2+}$  imobilizado.

Para clivagem da cauda de histidinas da proteína RecXHis foi usado o Kit Thrombin Cleavage Capture (Novagen). Para determinar a condição ideal de clivagem da proteína RecXHis, foram feitos testes variando-se o tempo de incubação e a concentração de trombina biotilada no sistema. Baseando-se nos resultados, foram estabelecidos os parâmetros de clivagem: temperatura de 4°C, já que RecX perde atividade em temperaturas mais elevadas; tempo de incubação de 12 horas, após testar os tempos de 2 até 16h, já que não foram detectados produtos de clivagem inespecíficos adicionais com a extensão do tempo e, além disso, a clivagem foi otimizada (cerca de 100%); 0,5U de trombina biotilada / mg de RecXHis, apesar de o fabricante recomendar o uso de 40U/mg. Essa redução foi efetuada a fim de diminuir a probabilidade de ocorrer uma proteólise inespecífica e de haver uma contaminação da amostra proteica de RecX com trombina e além disso foi efetuada para reduzir a quantidade de resina agarose-streptavidina utilizada na etapa de remoção da trombina biotilada. O sistema de proteólise variou de acordo com a quantidade de proteína tratada. Basicamente, o sistema continha 10mg da proteína RecXHis recém purificada na coluna Hi-Trap Chelating  $\text{Ni}^{2+}$ , tampão da trombina e 5U de trombina biotilada, num volume de reação de aproximadamente 4 mL. Após a incubação, 10 µg da amostra foram analisados em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5 ou 15%. Confirmada hidrólise da cauda His, a amostra foi dialisada contra tampão A contendo glicerol 5% (2x - 500 mL), e a troca foi feita após 4 horas do início da diálise, num total de 15 h. Posteriormente, à amostra foi adicionada a resina  $\text{Ni}^{2+}$  Sepharose™ High Performance (GE Healthcare) (100 µL resina / mg RecXHis) e streptavidina-agarose (Kit Thrombin Cleavage Capture) (15 µL resina / U de trombina biotilada). Antes do uso da resina  $\text{Ni}^{2+}$  Sepharose, esta foi equilibrada 2 vezes com 2 volumes de tampão A contendo glicerol 5%. Após adicionar a proteína de interesse ao tubo contendo as resinas, este foi incubado a 4°C durante 30 minutos, efetuando homogeneizações cada 10 minutos. Após incubação, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante coletado e quantificado utilizando método de Bradford (seção 3.3.6).

### 3.3.5 Estocagem das proteínas

Após a purificação e diálise das proteína de interesse, essas foram divididas em alíquotas de 20-100  $\mu$ L, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.6 Dosagem da concentração de proteína

A quantificação de proteínas (mg/mL) foi feita utilizando o método de Bradford (1976). A ligação do corante azul de Coomassie G250 (molécula negativamente carregada) à proteína gera um produto colorido cuja absorbância é proporcional à concentração de proteína. A concentração das amostras protéicas foi feita após a determinação da absorbância das mesmas em 595 nm utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

### 3.3.7 Eletroforese de proteína em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas como descrito por Sambrook *et al.* (1989) em tampão TAE 1x. As concentrações dos géis usados foram 0,5 e 3% (p/v). As amostras foram misturadas com tampão de amostra - ligação proteína-proteína, antes da sua aplicação no gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 20-30V por aproximadamente 4 horas. Para a visualização das proteínas, o gel foi incubado por 5 minutos com solução de azul de Coomassie e com solução descorante para proteína por no mínimo 1 hora. A proteína foi visualizada sob luz branca no EC<sup>3</sup> System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA USA).

### 3.3.8 Cristalização da proteína RecX

Para a determinação da condição ideal para a formação e o crescimento dos cristais de proteína foram feitas triagens usando os kits Crystal Screen 1 e 2 (Hampton Research). Como foram obtidos cristais tanto na presença da solução 16, 17 (kit

Crystal Screen 1) ou 41 (kit Crystal Screen 2), foi possível deduzir que a presença de  $\text{LiSO}_4$  era importante para a formação dos cristais. Condições próximas daquelas presentes nessas soluções foram posteriormente testadas. Os valores de pH do tampão foram: 7,5; 8,0; 8,5 e 9 e concentrações de  $\text{LiSO}_4$ : 0,5; 0,75; 1; 1,25 e 1,5 mol/L, na ausência ou na presença de  $\text{NiCl}_2$  (0,01 mol/L). Após inspeção visual, a condição em que se obteve os melhores cristais: pH 8,5 e concentrações de  $\text{LiSO}_4$  igual ou superior a 1 mol/L. Cristais da proteína RecX nativa (RecXHis após tratamento com trombina biotinilada) foram obtidos tanto pelo método da gota sentada quanto pelo método da gota suspensa, após 2-6 dias a 20°C, misturando 1  $\mu\text{L}$  da solução de proteína (3 mg/mL) e 1  $\mu\text{L}$  da solução do reservatório (0,1 mol/L de Tris HCl pH 8,5 e 1, 1,25 ou 1,5 mol/L de  $\text{LiSO}_4$ , na presença ou ausência de 0,01 mol/L de  $\text{NiCl}_2$ ). Para evitar a agregação dos cristais, foram adicionados à solução reservatório 10% (v/v) glicerol, 10% (v/v) PEG-4000 ou 10% (v/v) dioxano. O tempo necessário para formação dos cristais variou de acordo com a condição aplicada.

Os dados de difração de raios-X foram coletados de um agregado de cristais ou de um único cristal usando o detector de imagens MAR345 posicionado a 30 cm do cristal em gerador RU-H3RHB (Rigaku-MSD) equipado com um ânodo rotatório de cobre e espelhos Osmic. O sistema de resfriamento usado foi X-stream (Rigaku-MSD). Os dados foram coletados após tempos de exposição de 20 minutos a 12 horas. A solução crioprotetora foi a própria solução do reservatório contendo 10, 20 ou 30% (v/v) glicerol. O cristal foi mergulhado nas diferentes soluções de forma sucessiva, finalizando com 30% glicerol.



### 3.4 Ensaios *in vitro*

Na descrição dos sistemas de reação, quando não mencionado, a concentração dos componentes foi dada como concentração final e a concentração das proteínas considerando-as na forma monomérica.

#### 3.4.1 Ensaio de ligação das proteínas RecA e RecX ao DNA

##### 3.4.1.1 Ensaio de ligação das proteínas RecA e RecX ao DNA marcado com [ $^{32}\text{P}$ ]

Os oligonucleotídeos foram marcados com [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP como descrito: numa reação com volume final de 20  $\mu\text{L}$  foram misturados 2  $\mu\text{L}$  de tampão de reação da T4 polinucleotídeo quinase (10x), 20 pmoles do oligonucleotídeo (solução estoque 10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 10 U de T4 polinucleotídeo quinase (GE Healthcare) e 1,3 MBq de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (185 TBq/mmol). A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos e foi parada com a desnaturação da enzima a 70°C por 10 minutos. O dsDNA foi preparado misturando quantidades equimolares dos oligonucleotídeos complementares em tampão TM, num volume final de reação de 20  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, o sistema de reação foi aquecido durante 5 minutos a 95°C e esfriado em gelo por 10 minutos e estocado a -20°C.

Os ensaios de retardamento de migração eletroforética foram realizados em tampão de ligação DNA-proteína incubando a proteína RecAHis ou RecXHis (em concentrações crescentes) com 1,8  $\mu\text{mol/L}$  ssDNA (88 *mers*) WVC3 ou 1,1  $\mu\text{mol/L}$  dsDNA (88 bp) WVC3/WVC8 marcados com [ $^{32}\text{P}$ ], num volume final de 10  $\mu\text{L}$  por 15 minutos à 37°C. Nos ensaios onde as proteínas RecA e RecX foram incubadas conjuntamente, RecA foi adicionada em concentrações de 0 a 10  $\mu\text{mol/L}$  e RecX na concentração de 250 nmol/L no mesmo sistema de reação descrito. A reação foi parada com a adição de 2  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra – nativo (5x).

Os complexos proteína-DNA foram utilizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (4 ou 4,5%) em condição nativa (ausência de SDS) (Tabela 3.8). Os géis foram submetidos à pré-corrida a 50V por 30 minutos em tampão Tris-glicina (1x) antes da aplicação da amostra. A eletroforese foi desenvolvida a 60 V por 80 ou

100 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi seco utilizando o sistema de secagem de gel da BioRad, visualizado no phosphorimager FLA-5000 (Fuji Photo Film Company, Tokyo, Japan) e a imagem analisada utilizando o programa de densitometria AIDA (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany).

TABELA 3.8 - COMPOSIÇÃO DOS GÉIS UTILIZADOS PARA SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM CONDIÇÃO NATIVA.

COMPONENTES	GEL	
	4%	4,5%
Tampão Tris-glicina (10x)	1 mL	1 mL
Água	7,66 mL	7,5 mL
Acrilamida (30% T, 2,67% C)	1,33 mL	1,5 mL
10% (p/v) APS	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL
Volume final	10 mL	10 mL

#### 3.4.1.2 Ensaio de ligação da proteína RecA e RecX ao DNA não marcado

Os ensaios de ligação proteína-DNA de alta massa molecular foram realizados como descrito por Kurumizaka *et al.* (2000), porém utilizando como DNA alvo de ligação o vetor pTZ19R (2.871 pb) em diferentes conformações. O sistema de reação (20µL) tinha 20 µmol/L de dsDNA circular, 8 µmol/L de dsDNA linear ou 450 µmol/L de ssDNA circular, 2 µL de tampão de ligação DNA-proteína (10x) e a proteína RecXHis (0 - 10 µmol/L). Após incubação por 15 minutos a 37°C, foi adicionado ao sistema tampão de amostra -ligação DNA-proteína, e a amostra foi eletroforisada em gel de agarose 0,5% e tampão TAE 1x por 5 h a 3,6 V/cm. O gel foi corado com brometo de etídeo e exposto à luz UV. As imagens foram capturadas usando transiluminador EC<sup>3</sup> System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA USA).

### 3.4.2 Ligação covalente das proteínas RecA e RecX com o DNA induzida por luz UV

A substituição de um oxigênio do grupo fosfato do oligonucleotídeo por um enxofre permitiu a sua posterior derivatização com brometo de azidofenacil. A irradiação deste oligonucleotídeo derivatizado com luz UV no comprimento de onda acima de 300 nm gera intermediários reativos que induzem a formação de ligações covalentes entre os oligonucleotídeos e as moléculas de proteína próximas em um tempo bastante curto (30s). A utilização de comprimentos de onda superiores a 254 nm evita a formação de foto-lesões como a clivagem do DNA e oxidação, as quais poderiam afetar a integridade e a funcionalidade dos componentes presentes na mistura (Meisenheimer & Koch, 1997). Isto ocorre, pois a luz UV, no comprimento de 254 nm, não apenas é absorvida pelas bases do DNA, mas é também absorvida por outros grupos funcionais do oligonucleotídeo ou da proteína.

A ligação do grupo azidofenacil ao oligonucleotídeo fosforotiolado (Apêndice A) foi feita como descrito a seguir. O oligonucleotídeo fosforotiolado SRW3 (-7/-6) foi ressuspenso em 100 mmol/L de bicarbonato de trietilamônio pH 8,0 (concentração final de 100  $\mu$ mol/L). A modificação foi obtida pela adição de 100 mmol/L de brometo de *p*-azidofenacil, APAB (Sigma) dissolvido em 99% acetonitrila e incubação a 25°C por 4 h. Uma vez que o grupamento reativo incorporado pode ser destruído por fotólise quando exposto à luz direta, foi necessário manter todo o sistema em tubos plásticos negros. O oligonucleotídeo conjugado gerado foi purificado por gel filtração usando coluna Microspin G-50 (GE Healthcare) e posteriormente marcado com [ $^{32}$ P] através da sua incubação com T4 polinucleotídeo quinase e [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, como descrito na seção 3.4.1.1.

Para o experimento de formação de ligação covalente, 0,8  $\mu$ mol/L do oligonucleotídeo conjugado e marcado com [ $^{32}$ P] foi incubado com 5  $\mu$ mol/L RecA, 5  $\mu$ mol/L RecX ou 5  $\mu$ mol/L RecA + 5  $\mu$ mol/L RecX a 37°C em tampão STA, num volume total de 10  $\mu$ L. As reações foram incubadas por 15 minutos e então irradiadas com luz UV a 365 nm por 30 s usando UV Stratalinker 1800 (Stratagene). A uma parte da reação (2  $\mu$ L) foi adicionado tampão de amostra - nativo e aos outros 8  $\mu$ L restantes, tampão de amostra - SDS-PAGE. As amostras foram então aplicadas no gel

nativo e eletroforisadas por 100 minutos a 60V ou foram aquecidas a 95°C por 3 minutos, aplicadas em SDS-PAGE (12,5%) e eletroforisadas por 40 minutos a 200V, respectivamente. A migração da proteína em SDS-PAGE foi acompanhada devido à presença de um marcador pré-corado (Invitrogen) na corrida eletroforética. Os géis foram secos utilizando o sistema de secagem de gel da BioRad, visualizados no phosphorimager FLA-5000 (Fuji Photo Film Company, Tokyo, Japan) e as imagens analisadas utilizando o programa de densitometria AIDA (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany).

### 3.4.3 Ensaios de interação proteína-proteína

Os ensaios de interação proteína-proteína foram realizados utilizando-se resina de Sepharose Chelating FF (GE Healthcare) e eletroforese em duas dimensões, segundo Schägger & Von Jagow (1991) com algumas modificações.

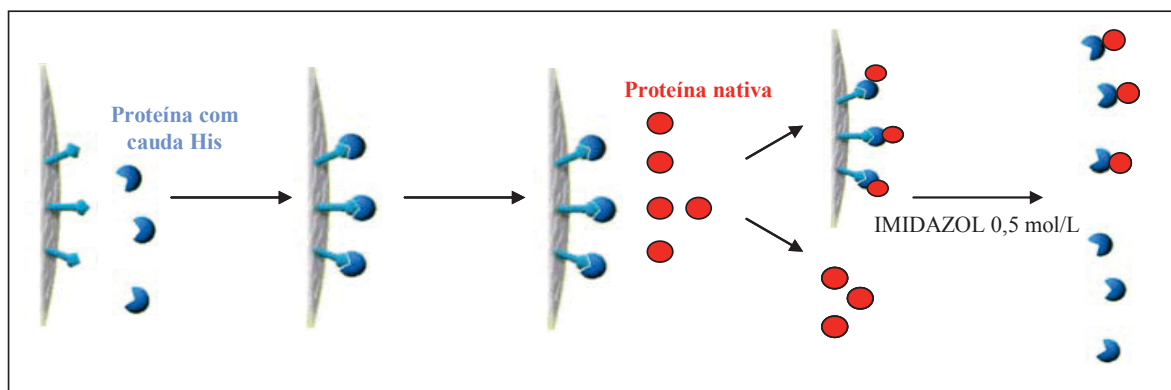
#### 3.4.3.1 Determinação da interação RecA-RecX utilizando resina de sepharose *chelating* FF

A resina sepharose *chelating* pode ser carregada com íons metálicos e posteriormente ser utilizada para imobilizar proteínas que apresentam cauda His. Para determinar se as proteínas RecA e RecX interagem entre si, através do método de imobilização em resina de sepharose ligada a íons níquel (sepharose-Ni<sup>2+</sup>), foi necessária a purificação de uma das proteínas na sua forma nativa e a outra contendo a cauda His.

A proteína RecAHis ou RecXHis num volume de 50µL (4 e 8 µmol/L, respectivamente) foi incubada por 30 minutos com 15 µL da suspensão de resina sepharose *chelating* FF previamente carregada com Ni<sup>2+</sup> como recomendado pelo fabricante (GE Healthcare) e equilibrada com tampão A contendo 5% de glicerol. Após este período, a amostra foi centrifugada (500xg, 5 minutos), o sobrenadante coletado para análise, e o precipitado ressuspensão por inversão em 75 µL de tampão A contendo glicerol 5% e incubado durante 5 minutos. Após este período, a amostra foi

centrifugada (500xg, 5 minutos) e a proteína RecX ou RecA nativa na concentração de 8 ou 4  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente, foi adicionada na presença ou ausência de ATP 1mmol/L ou ssDNA LHBT-r 80 nmol/L (Apêndice A), num volume final de 50  $\mu\text{L}$ , e incubada à temperatura ambiente por mais 30 minutos. Após incubação, a amostra foi centrifugada (500xg, 5 minutos), o sobrenadante coletado para análise, e o sedimento ressuspense por inversão em 75  $\mu\text{L}$  de tampão A contendo 5% de glicerol durante 5 minutos. Após a centrifugação (500xg, 5 minutos), o precipitado de resina foi ressuspense por inversão em tampão A contendo 5% de glicerol e 0,5 mol/L de imidazol incubado por 5 minutos e centrifugado novamente a 500xg por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado para análise por SDS-PAGE.

**FIGURA 3.2 - ETAPAS DO ENSAIO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA UTILIZANDO RESINA DE SEPHAROSE ligada a íons  $\text{Ni}^{2+}$ .**



As setas em azul claro presas a uma superfície representam a resina Sepharose Chelating FF carregadas com  $\text{Ni}^{2+}$ , os círculos em azul e vermelho representam as proteínas com cauda His e nativa, respectivamente.

FONTE: Adaptado do manual de instruções da GE Healthcare.

#### 3.4.3.2 Determinação da interação RecA-RecX por eletroforese em duas dimensões (2D)

Neste método foram utilizadas a eletroforese em gel de agarose (condição nativa) e a eletroforese em gel SDS-PAGE (condição desnaturante). As proteínas que formam complexos migram juntas na primeira dimensão e normalmente apresentam

um perfil de migração diferenciado daquele apresentado pelas proteínas isoladas. Desta forma, a análise do perfil de migração na primeira dimensão permite sugerir a interação das proteínas, que pode ser confirmada na eletroforese de segunda dimensão. Como a segunda dimensão é realizada em condição desnaturante, o complexo protéico é desfeito, e as proteínas constituintes do mesmo são resolvidas de acordo com a massa molecular de cada uma, numa mesma linha do gel. Caso as proteínas ensaiadas não interajam entre si, as proteínas serão resolvidas também de acordo com a massa molecular, mas não estarão presentes numa mesma linha do gel da segunda dimensão.

A mistura de reação (25  $\mu$ L) contendo 23  $\mu$ mol/L da proteína RecXHis, 7  $\mu$ mol/L da proteína RecAHis, ou 8  $\mu$ mol/L da RecXHis juntamente com 4  $\mu$ mol/L da RecAHis foram incubadas por 15 minutos a 37°C em tampão de ligação proteína-proteína. Após este período, foi adicionado tampão de amostra - ligação proteína-proteína, e a reação foi submetida à eletroforese de primeira dimensão.

Na primeira dimensão, as corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de agarose (0,5 ou 3%) a 4 V/cm em tampão TAE 1x. Para determinar o efeito do azul de Coomassie G250 no perfil de migração e interação das proteínas, este corante foi adicionado às amostras na concentração de 0,26% (p/v). O tempo das corridas eletroforéticas foi de 4 horas ou até o azul de bromofenol atingir 4/5 do comprimento do gel. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas em solução de azul de Coomassie por 5 minutos e solução descorante para proteína por no mínimo 1 hora.

A estratégia adotada na segunda dimensão para analisar as amostras quando estas foram aplicadas em gel de agarose 3% apresentou etapas distintas da adotada quando o gel de agarose 0,5% foi usado.

Após o término da primeira dimensão em gel de agarose 0,5%, o gel foi cortado (sentido do seu comprimento) com o auxílio de um estilete, para separar as linhas do mesmo (Figura 3.3, etapa 1). Em seguida, cada linha foi cortada transversalmente no sentido da largura do gel, formando cubos de agarose (etapa 2a), que foram transferidos para tubos plásticos de 1,5 mL devidamente identificados (etapa 3a). Após a fusão do cubo de agarose a 60°C, foi adicionado tampão de amostra - SDS-PAGE, e os tubos foram incubados por 3 minutos a 95°C. Posteriormente, as amostras foram aplicadas, ainda quentes, no gel da segunda dimensão (etapa 4a). A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em gel SDS-PAGE 12,5% utilizando o

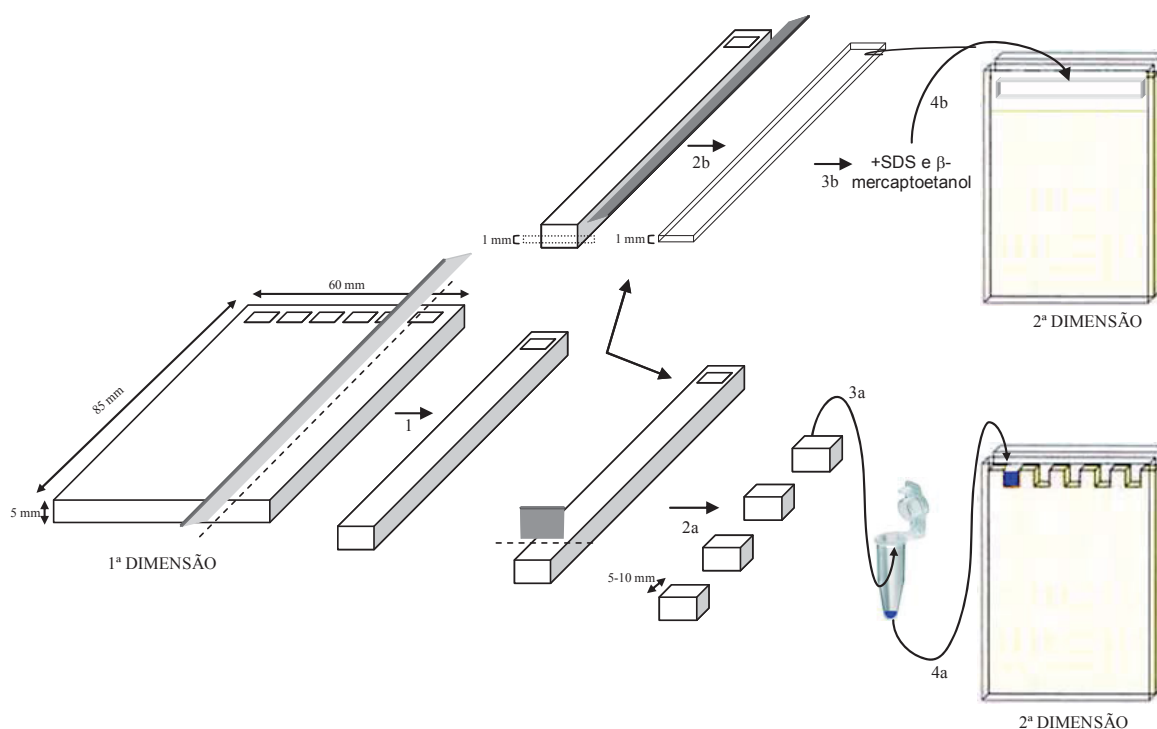
sistema de minigéis da Hoefer. A composição do gel assim como os tampões de corrida utilizados e tempo de corrida estão descritos na seção 3.3.1.

Após o término da primeira dimensão em gel de agarose 3%, as linhas também foram isoladas, como descrito anteriormente (Figura 3.3, etapa 1). Em seguida, as linhas de gel foram cortadas longitudinalmente em lâminas com espessura de aproximadamente 1mm, compatível com o Sistema de Minigéis da Hoefer (etapa 2b). Quanto mais próximos da base do poço foram feitos os cortes, maior foi a quantidade de proteína presente. As lâminas de gel foram incubadas durante 15 minutos em uma solução contendo 1% de SDS (p/v) e 15 mmol/L de  $\beta$ -mercaptoetanol (etapa 3b). O SDS desnatura as proteínas e forma complexos proteína-SDS negativamente carregados e o  $\beta$ -mercaptoetanol preserva o estado reduzido das proteínas desnaturadas, permitindo que a separação das proteínas, no gel de segunda dimensão, ocorra de acordo com a massa molecular das mesmas. A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em gel SDS-PAGE 12,5% utilizando o sistema de minigéis da Hoefer (seção 3.3.1).

Para realizar a 2ª dimensão das amostras presentes na lâmina do gel, apenas o gel separador foi preparado sem utilizar pente formadores de poços, deixando um espaço de 2 cm no topo do gel. Uma vez preparado o gel SDS-PAGE (seção 3.3.1), a placa de vidro do sistema foi separada do gel e a lâmina de gel da 1ª dimensão foi posicionada próxima à parte superior do gel SDS-PAGE. O vidro foi novamente reposto na posição original, evitando a permanência de bolhas entre os géis. A permanência das bolhas impede a transferência completa das proteínas para o gel de poliacrilamida ou ainda faz com que o tampão passe tanto através do gel (como é desejado) quanto entre o vidro e o gel, comprometendo a análise dos resultados. O gel foi submetido à corrida eletroforética como descrito no item 3.3.1. Os géis SDS-PAGE foram corados com solução de azul de Coomassie por no mínimo 20 minutos e descorados em solução descorante para proteína. As imagens foram capturadas usando transiluminador EC<sup>3</sup> System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA USA).



**FIGURA 3.3 - ESQUEMA DO ENSAIO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA UTILIZANDO ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.**



Após corrida eletroforética em gel de agarose 0,5%, cada linha foi isolada (1) e cortada em forma de cubos (2a), os quais foram transferidos para tubos plásticos de (1,5 mL) devidamente identificados (3a). Após a fusão do cubo de agarose a 60°C, foi adicionado tampão de amostra - SDS-PAGE, e os tubos foram incubados por 3 minutos a 95°C. Posteriormente, as amostras foram aplicadas no gel da segunda dimensão (4a). Após corrida eletroforética dos sistemas de reação em gel de agarose 3%, cada linha foi isolada (1) e cortada longitudinalmente (2b). As lâminas de gel foram incubadas durante 15 minutos em uma solução contendo 1% de SDS (p/v) e 15 mmol/L de β-mercaptoetanol (3b). A placa de vidro do sistema foi separada do gel e a lâmina de gel da 1a dimensão foi posicionada na parte superior do gel SDS-PAGE. O vidro foi reposto na posição original e o gel submetido à corrida eletroforética (4b).

#### 3.4.4 Ensaio de troca de fita de DNA

Na reação de troca de fitas, o ssDNA φX174 circular ( $S_1$ ) e o dsDNA φX174 linear homólogo ( $S_2$ ) são recombinados para formar uma molécula de dsDNA circular aberta (P) e uma molécula de ssDNA linear (Figura 2.6A). A proteína SSB facilita a efetivação deste processo (Lavery & Kowalczykowski, 1992).

Os ensaios de troca de fitas de DNA foram realizados num sistema de 20 μL pré-incubando a proteína RecA (6,7 μmol/L) e ssDNA φX174 circular (22,6 μmol/L)

por 10 minutos a 37°C, na presença do tampão de recombinação e do sistema de regeneração de ATP (5 mmol/L fosfocreatina e 10 U/mL fosfocreatina quinase). A proteína SSB (2 µmol/L) e o ATP (3 mmol/L) foram então adicionados e o sistema incubado por mais 6 minutos. Quando indicado, a proteína RecX foi adicionada às reações nas concentrações indicadas e incubada por 6 minutos. A reação foi iniciada com a adição de dsDNA  $\phi$ X174 linear (15,6 µmol/L). As reações foram incubadas por 30 ou 90 minutos. Para parar a reação, 5 µL de fenol equilibrado e 3 µL de SDS 10% foram adicionados. As amostras foram submetidas à eletroforese por 5 horas a 3,6 V/cm em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (1x). O gel foi corado com brometo de etídeo e exposto à luz UV. As imagens foram registradas usando transiluminador EC<sup>3</sup> System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA USA).

### 3.4.5 Ensaio de ligação do ATP

Como a ligação do ATP à RecA é temporária, pois sua hidrólise pode ocorrer rapidamente, para a detecção da ligação do ATP no seu sítio, foi necessário utilizar um método que induzisse a formação de uma ligação covalente entre o ATP e a proteína (*crosslinking*). A irradiação do ATP com a luz UV gera intermediários reativos que induzem a formação de ligações covalentes entre o ATP e a proteína se ambos estiverem em contato. O ADP foi utilizado como competidor frio para confirmar a especificidade da interação. Se a ligação proteína-ATP for específica, ADP frio em excesso ocupará o sítio antes ocupado pelo ATP marcado, inibindo a formação da ligação covalente proteína-ATP.

O sistema de reação (20 µL) contendo 5µL de tampão de ligação de ATP-proteína, ssDNA  $\phi$ X174 circular (6,5 µmol/L), proteína RecAHis mutantes (L54Q ou L54Q G73A) ou RecAHis (2,5 µmol/L), e/ou RecXHis (2,5 ou 10 µmol/L) e 37 kBq de [ $\alpha^{32}$ P]ATP (111 TBq /mmol) foi depositado numa placa de vidro coberta por filme plástico (Parafilm<sup>TM</sup>) a qual foi mantida no gelo. Posteriormente as amostras foram irradiadas durante 20 minutos com lâmpada UV (254 nm, 240 V, UVG-54, UVP, San Gabriel, CA, USA) posicionada a uma distância de 3 cm das amostras. A reação foi parada com a adição de tampão de amostra - SDS-PAGE e posterior aquecimento a

95°C por 3 minutos, e analisada por SDS-PAGE (12,5%). O gel foi corado com solução azul de Coomassie, descorado, e deixado durante 12-24 horas em um recipiente contendo grande volume de água (aproximadamente 1L), para remover todo o [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]ATP não ligado à proteína. O gel então foi seco utilizando o sistema de secagem de gel da BioRad, visualizado no phosphorimager FLA-5000 (Fuji Photo Film Company, Tokyo, Japan) e a imagem foi analisada utilizando o programa de densitometria AIDA (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany). Um cuidado importante tomado foi o de expor as amostras à luz UV assim que o ATP marcado foi adicionado. Antes da exposição à luz UV, todo o sistema foi mantido em banho de gelo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, e em uma das amostras foi adicionado ADP (4 mmol/L) ao sistema.

### 3.4.6 Ensaio de atividade ATPásica

O ensaio de atividade ATPásica dependente de DNA foi utilizado para monitorar de forma indireta a ligação da proteína RecA ao DNA (Kowalczykowski, 1991). A reação de hidrólise de ATP foi realizada na presença de tampão ATPase, 44  $\mu\text{mol/L}$  ou como mencionado de ssDNA  $\phi\text{X174}$  circular (ou 10  $\mu\text{mol/L}$  dsDNA  $\phi\text{X174}$  linear), 1,2  $\mu\text{mol/L}$  ou como mencionado de RecAHis (ou RecAHis mutante L54Q) e/ou 5  $\mu\text{mol/L}$  ou como mencionado de RecXHis, 0,2  $\mu\text{mol/L}$  de SSB e 0,4 mmol/L de ATP. O sistema de reação (20  $\mu\text{L}$ ) contendo 2  $\mu\text{L}$  de tampão ATPase (10x) e dois componentes (RecA e ssDNA, RecA e RecX, ou RecX e DNA) foi pré-incubado por 10 minutos a 37°C antes da adição do terceiro componente juntamente com SSB e ATP. Alternativamente, os três componentes (RecA, RecX e ssDNA) foram pré-incubados conjuntamente por 10 minutos a 37°C, antes da adição de SSB e ATP.

A quantificação das taxas de hidrólise de ATP foi iniciada após a adição do ATP marcado, o qual foi preparado através da mistura de 1,1 MBq de [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP (111 TBq/mmol), 50  $\mu\text{L}$  de ATP frio (4 mmol/L) e 97  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. As reações foram paradas após diferentes tempos de incubação pela adição de 5 volumes de ácido

fórmico frio (2 mol/L) a cada amostra de reação, que foram mantidas em banho de gelo. Alíquotas (1 ou 2  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra foram aplicadas na placa de celulose microcristalina ligada à polietilenoimina modificada (*polyethilenimine-modified microcrystalline cellulose*, PEI) (J. T. Baker) preparada para cromatografia em camada delgada (CCD), a aproximadamente 2 cm da base da placa. Após a secagem das amostras à temperatura ambiente, a placa de CCD foi enrolada na forma de um tubo, através da união de suas pontas com uma fita adesiva, e colocada num recipiente contendo 200 mL de tampão de cromatografia coberto com filme plástico. Como a cromatografia era ascendente, apenas 1,5 cm da placa de CCD foi coberto com o tampão. Após duas horas de cromatografia, a placa foi seca à temperatura ambiente. A quantificação do ATP e ADP presentes nas preparações foi feita normalmente após 12 horas de sensibilização utilizando o programa de densitometria AIDA (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany) após captação da imagem no phosphorimager FLA-5000 (Fuji Photo Film Company, Tokyo, Japan). Os valores obtidos foram usados para calcular a quantidade de ATP hidrolisado e a quantidade de ATP hidrolisado por mol de RecA por unidade de tempo (*turnover* ou  $k_{\text{cat}}$ ).

A quantidade de ATP hidrolisado e *turnover* foram calculados utilizando as fórmulas abaixo:

$$\text{ATP hidrolisado } (\mu\text{mol/L}) \quad \left\{ \left( \frac{\text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP}} \right)_x - \left( \frac{\text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP}} \right)_0 \right\} * [\text{ATP}]$$

$$\text{Turnover } (\text{min}^{-1}) \quad \frac{\text{ATP hidrolisado}}{[\text{Prot.}] * T}$$

Sendo:

ADP e ATP - percentagem de ADP e ATP detectada, respectivamente,

[ATP] - concentração de ATP adicionado a reação,

índice 0 - valores referentes ao controle negativo (sem proteína),

índice X - valores referentes à amostra testada,

[Prot.] - concentração da proteína testada quanto à atividade ATPásica na reação (em  $\mu\text{mol/L}$ ),

T - tempo de incubação (em minutos).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fenótipo de sensibilidade a agentes mutagênicos apresentado pelo mutante *recX* de *H. seropedicae* sugere que o produto do gene *recX* participa dos processos em que a proteína RecA tem função primordial como o Reparo SOS (Galvão, 2001; Galvão *et al.*, 2003). Essa observação sugere que a proteína RecX de *H. seropedicae* pode atuar em outros processos envolvendo a proteína RecA como, por exemplo, a recombinação homóloga. Considerando que essas funções de RecA são críticas para a sobrevivência da célula bacteriana, o entendimento de seus mecanismos e a determinação do envolvimento das proteínas auxiliares e moduladoras destes processos é um dos problemas mais interessantes da bioquímica e fisiologia de microrganismos. Para contribuir para esse entendimento, neste trabalho as proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae* foram superexpressas em *E. coli*, purificadas e caracterizadas bioquimicamente.

### 4.1 Clonagem, Expressão e Purificação da proteína RecA

#### 4.1.1 Clonagem e Expressão da proteína RecA

Como detalhado nos materiais e métodos seção 3.2.8 foram obtidos diversos plasmídeos codificando para a proteína RecAHis e RecA nativa de *H. seropedicae*. Os plasmídeos (1) pAETWT-HMK, (2) pAET-HMK e (3) pAET-G73A foram utilizados para a expressão da proteína (1) RecAHis selvagem, (2) RecAHis contendo a substituição de um resíduo de leucina por glutamina na posição 54 (L54Q) e (3) RecAHis contendo uma dupla substituição L54Q e G73A. O plasmídeo pCWG9 foi utilizado para a expressão da proteína RecA nativa. Os plasmídeos pAETWT-HMK, pAET-HMK, pAET-G73A ou pCWG9 foram introduzidos nas linhagens de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) pLysS ou B834(DE3) para a expressão das proteínas de interesse (Tabela 3.6). Os mesmos plasmídeos foram também introduzidos na linhagem *recA*<sup>-</sup>BLR ( $\lambda$ DE3), porém não foi observada a expressão das proteínas de interesse nas diversas condições testadas (variados tempos de indução e concentrações de IPTG ou lactose). Após a superexpressão de RecA a partir de qualquer uma das construções,

cerca de 75% da proteína de interesse apresentou-se na fração solúvel do extrato celular.

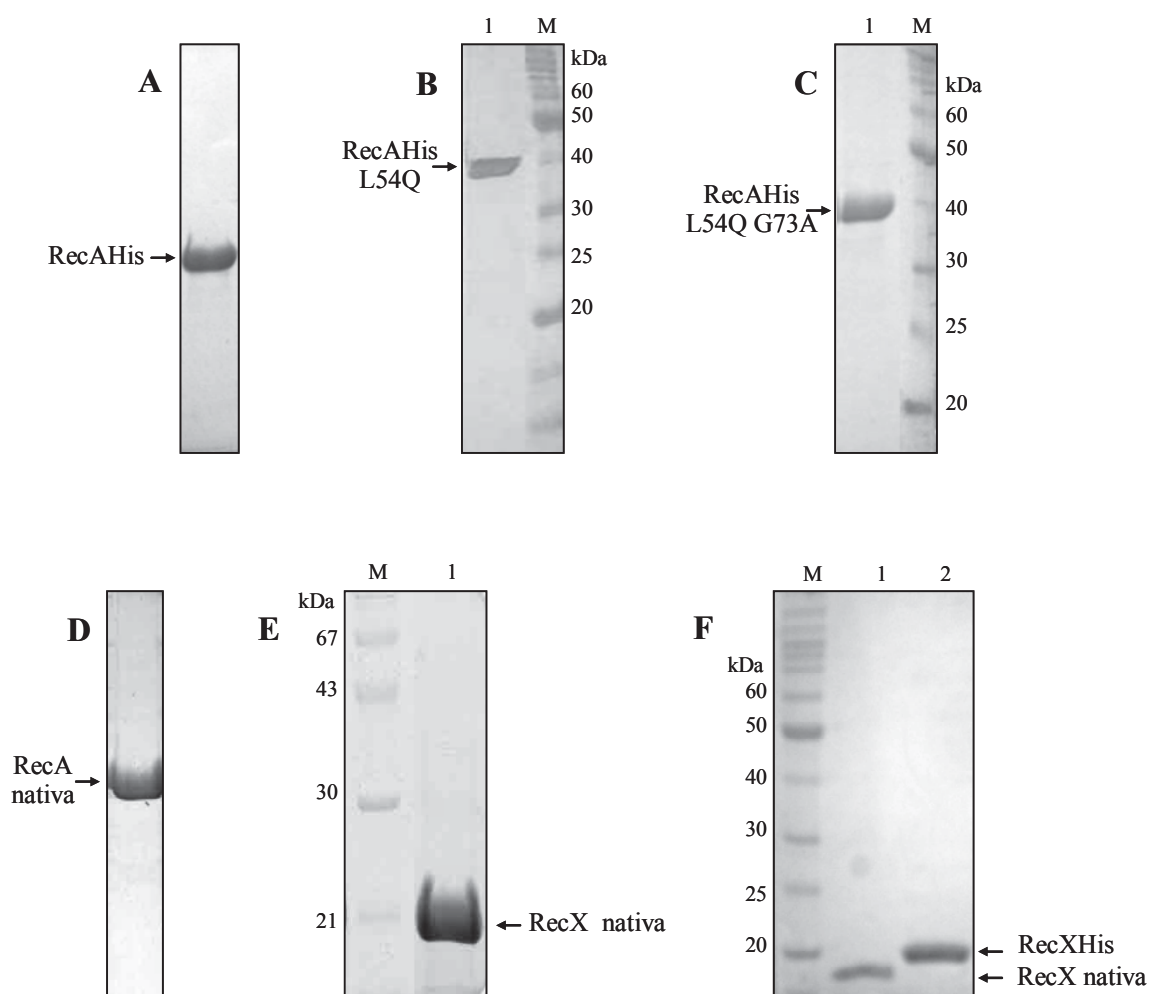
#### 4.1.2 Purificação da proteína RecA

##### 4.1.2.1 Purificação da proteína RecA ligada à cauda de histidina

As proteínas RecAHis selvagem, RecAHis mutante L54Q e RecAHis mutante L54Q G73A foram superexpressas em *E. coli* B834(DE3) contendo o plasmídeo pAETWT-HMK, pAET-HMK ou pAET-G73A, respectivamente, após indução com IPTG. Tanto a proteína RecA selvagem quanto as mutantes foram purificadas usando coluna Hi-Trap-Chelating-Ni<sup>2+</sup> (seção 3.3.3). Os rendimentos obtidos foram: 88 mg de RecAHis por litro de cultura (pureza de 96-98%), 100 mg de RecAHis L54Q por litro de cultura (pureza de 96-97%) e 180 mg de RecAHis L54Q G73A por litro de cultura (pureza de 94-96%). As três frações com maior grau de pureza foram dialisadas separadamente contra tampão A (Tabela 3.4) contendo glicerol 50%. Esse processo permitiu o aumento da concentração das amostras (cerca de 10 mg/mL) sem a formação de agregados. Após a diálise, a fração contendo as proteínas RecAHis, RecAHis L54Q e RecAHis L54Q G73A nas purezas de 98%, 97% e 96%, respectivamente (determinadas densitometricamente a partir de géis SDS-PAGE corados com azul de Coomassie; Figura 4.1 A, B, C), foram utilizadas nos ensaios *in vitro*.



**FIGURA 4.1 - PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RecA E RecX DE *Herbaspirillum seropedicae*.**



As proteínas RecA e RecX foram purificadas como descrito na seção 3.3.3. O grau de pureza das proteínas RecAHis (A), RecAHis L54Q (B), RecAHis L54Q G73A (C), RecA nativa (D), RecX nativa (E) e RecXHis após (linha 1) e antes (linha 2) da clivagem do peptídeo N-terminal (F), foi determinado após eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% e coloração das proteínas com azul de Coomassie. O marcador de massa molecular está indicado.

#### 4.1.2.2 Purificação da proteína RecA nativa

A proteína RecA nativa (39 kDa) foi expressa em *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)pLysS contendo o plasmídeo pCWG9 após indução com IPTG. Para a purificação da proteína RecA nativa, a fração sobrenadante obtida após o cultivo e lise das células foi precipitada com polietilenoimina e com sulfato de amônio, como descrito na seção 3.3.3.2.1. A polietilenoimina é um polímero carregado positivamente que interage com proteínas ácidas, como é o caso da RecA de *H. seropedicae*, e que interage com o DNA, molécula na qual a RecA também se liga. Sendo assim, a adição de polietilenoimina ao extrato celular levou à precipitação de RecA. A proteína RecA foi solubilizada em 5% de saturação de sulfato de amônio em tampão R. O procedimento de lavagem e dissolução em diferentes concentrações de sulfato de amônio promoveu a eliminação de outras proteínas contaminantes. A adição de sulfato de amônio acima de 50% de saturação precipitou a proteína RecA.

A proteína RecA de *H. seropedicae* apresenta um pI calculado de 4,97 e por isto optou-se por utilizar a coluna trocadora de ânions fraca, a DEAE-Sepharose. A análise das frações protéicas coletadas permitiu verificar que a proteína RecA eluiu mais concentrada em aproximadamente 0,2 mol/L de NaCl. As frações eluídas com tampão contendo concentrações superiores de NaCl apresentavam a proteína RecA já diluída e ainda proteínas contaminantes. As frações eluídas próximas a 0,2 mol/L de NaCl foram dialisadas e a de maior grau de pureza (94%) foi utilizada nos ensaios *in vitro* (Figura 4.1D). A proteína RecA nativa presente nessa fração apresentou uma concentração da 2,3 mg/mL. As colunas de Heparina-Sepharose CL-6 empacotada (1,6x10cm, GE Healthcare) e gel filtração (Superose 6, GE Healthcare) foram utilizadas como segunda etapa cromatográfica, mas não foi detectada melhoria da pureza da RecA. A substituição da coluna DEAE-Sepharose pela coluna Q-Sepharose empacotada (1,6x21 cm, GE Healthcare), Resource Q (1 mL, GE Healthcare) ou gel filtração (Superose 6, GE Healthcare) produziram preparações de RecA mais diluídas e de menor grau de pureza. Dessa forma, foi adotado como procedimento padrão de purificação da proteína RecA nativa, a precipitação com polietilenoimina e sulfato de amônio, seguida de cromatografia em coluna DEAE- Sepharose.

## 4.2 Clonagem, Expressão, Purificação e Cristalização da proteína RecX de *Herbaspirillum seropedicae*

### 4.2.1 Clonagem e Expressão da proteína RecX

Os plasmídeos pCWG3 e pXT7 foram utilizados para a expressão da proteína RecXHis e RecX nativa, respectivamente (Tabela 3.6). Cerca de 75% das proteínas RecXHis e RecX nativa estavam presentes na fração solúvel do extrato celular.

### 4.2.2 Purificação e Cristalização da proteína RecX

Para determinar as condições ideais de purificação da proteína RecX foram testadas diversas condições de purificação variando-se tampões, pHs e a concentração de sal. Os tampões que permitiram a obtenção da proteína RecX solúvel em maior concentração (concentração 2 vezes maior do que nas demais condições testadas) foram o A<sub>NI</sub> para a purificação, o tampão A contendo glicerol 50% para a diálise e posterior armazenamento da proteína a -80°C e o tampão A contendo glicerol 5%, para os ensaios de cristalização.

Ao dialisar a fração eluída da coluna Hi-Trap *chelating* Ni<sup>2+</sup> em tampão A<sub>NI</sub>, contra o tampão A contendo glicerol 50%, a concentração da proteína dobrou e a concentração de sal diminuiu cerca de 1 décimo da original. Tais mudanças resultaram na agregação da proteína RecXHis. Quando as preparações dialisadas continham cerca de 20 mg/mL da proteína RecXHis em tampão A<sub>NI</sub> ocorreu a precipitação de mais de 90% da proteína. Concentrações de aproximadamente 3 mg/mL resultaram numa perda menor (30%). Para evitar a precipitação, NaCl (500 mmol/L) foi adicionado ao tampão de diálise. Entretanto essa medida foi empregada com cautela uma vez que poderia interferir nos ensaios de atividade dessa proteína, já que a proteína RecA é sensível a íons monovalentes (Weinstock *et al.*, 1981; McEntee *et al.*, 1981; Zaitsev & Kowalczykowski, 1998). Weinstock *et al.* (1981) mostraram que a formação de complexos entre a RecA de *E. coli* (EcRecA) e o DNA dupla-fita (dsDNA) na presença de ATPγS é extremamente sensível à concentração de íons monovalentes. McEntee *et al.* (1981) também mostraram que KCl na concentração de 120 mmol/L inibe a atividade de ligação ao dsDNA e a atividade ATPásica da proteína EcRecA na

presença de dsDNA. Para inibição da ligação ao DNA simples-fita (ssDNA) e da atividade ATPásica da EcRecA na presença de ssDNA, a concentração de KCl necessária foi de 300 e 450 mmol/L, respectivamente (McEntee *et al.*, 1981). Além disso, Zaitsev & Kowalczykowski (1998) mostraram que a atividade ATPásica de EcRecA diminui com o aumento da concentração de NaCl: na concentração de 500 mmol/L a proteína apresentou apenas 20% de sua atividade.

Paralelamente aos testes para determinação das condições de purificação e diálise, o operon nativo *recArecX* foi clonado no vetor pET28a, produzindo o plasmídeo pAX (Tabela 3.6). Esperava-se que a superexpressão de ambas as proteínas coordenadamente favorecesse a solubilidade de RecX, como já foi verificado para outras proteínas (Martin Buck, comunicação pessoal). Células B834(DE3) contendo o plasmídeo pAX superexpressaram apenas a proteína RecA, indicando que a sequência atenuadora presente entre os genes *recA* e *recX* reduz substancialmente a expressão da proteína RecX. Diante dessa limitação, essa estratégia foi abandonada.

#### 4.2.2.1 Purificação da RecX ligada à cauda de histidina

A purificação em larga escala da proteína RecXHis (21 kDa) utilizando coluna Hi-Trap-Chelating-Ni<sup>2+</sup> (seção 3.3.3.1.1) resultou em 20-130 mg de proteína por litro de cultura (pureza de 95-97%). As três frações mais puras foram dialisadas separadamente contra tampão A contendo glicerol 50%. Ao longo das purificações, foram obtidas frações contendo a proteína RecXHis solúvel na concentração de até 30 mg/mL, que foram diluídas antes da diálise para evitar precipitação. A fração que apresentou maior grau de pureza (97%) foi usada nos ensaios *in vitro* (Figura 4.1F, linha 2). A identidade da proteína RecXHis expressa e purificada foi confirmada por análises de MALDI-TOF de produtos de digestão triptica. Essa análise foi realizada pela GE Healthcare do Brasil.

#### 4.2.2.2 RecX nativa

A proteína RecX nativa foi purificada por cromatografia em coluna SP-sepharose. Alternativamente, a proteína RecXHis foi tratada com trombina para hidrólise do peptídeo N-terminal contendo a cauda His da proteína.

##### 4.2.2.2.1 Purificação da proteína RecX nativa em coluna SP Sepharose

Células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)pLysS contendo o plasmídeo pXT7-7 foram induzidas com IPTG e expressaram uma proteína de aproximadamente 17,8 kDa, correspondente à proteína RecX nativa. Uma vez que o pI calculado da proteína RecX de *H. seropedicae* foi de 10,1, a coluna SP-Sepharose foi utilizada para a sua purificação. A análise das frações protéicas coletadas permitiu verificar que a proteína RecX começou a ser eluída em 0,4 mol/L de NaCl, juntamente com proteínas contaminantes e eluiu de forma mais concentrada e com menor grau de contaminação a partir de 0,5 mol/L até 0,6 mol/L de NaCl. Foram obtidos 80 mg de proteína num grau de pureza acima de 90% por litro de cultura. Para evitar a precipitação da proteína RecX durante a diálise foi necessário diluir as amostras até a concentração próxima de 1 mg/mL. Mesmo após a diálise contra glicerol 50% a concentração máxima obtida de RecX foi de 1 mg/mL. A preparação que apresentou maior grau de pureza (94%; Figura 4.1E) foi utilizada nos ensaios *in vitro* descritos a seguir. Cromatografia em Heparina-Sepharose foi utilizada como segunda etapa cromatográfica, mas não houve melhoria da pureza.

##### 4.2.2.2.2 Clivagem do peptídeo N-terminal contendo a cauda His da proteína RecXHis

Dez miligramas da proteína RecXHis com grau de pureza de 97% foram utilizados no tratamento com trombina biotinilada. A trombina foi utilizada para clivar o peptídeo N-terminal da RecXHis, e conseqüentemente obter a proteína na sua forma nativa para ensaios de cristalização posteriores. As condições de clivagem utilizadas estão descritas na seção 3.3.4. A proteína RecXHis foi adicionada ao sistema de reação

na concentração de 20 mg/mL. Durante a clivagem foram detectados agregados protéicos; a formação do agregado protéico aumentou durante a diálise contra tampão A contendo glicerol 5%. Ao se aumentar a concentração de NaCl para 0,5 mol/L houve a resolubilização da proteína, porém a proteína RecX não cristalizou. Desta forma, nos ensaios de cristalização, foi utilizada a fração da proteína RecX que se manteve solúvel após a diálise do sistema de reação RecXHis (20mg/mL)+trombina contra o tampão A contendo glicerol 5%, ou ainda, a fração obtida após a diluição da amostra (até a RecX atingir a concentração de aproximadamente 3 mg/mL) e sua posterior diálise contra o mesmo tampão. Essa última estratégia permitiu a obtenção da proteína RecX nativa apenas na forma solúvel. Ambas as estratégias geraram amostras protéicas na concentração máxima de 3 mg/mL. As colunas Microcon YM10 (Centrifugal Filter Units - Millipore) foram utilizadas, então, para concentrar a proteína. Durante o processo de centrifugação não houve a formação de nenhum floculado, indicando que não estava ocorrendo agregação protéica. Entretanto, ao determinar a concentração de proteína, verificou-se que esta não havia aumentado provavelmente devido à adsorção da RecX na membrana. Outras proteínas apresentam o mesmo comportamento (Siva R. Wigneshweraraj, comunicação pessoal). Os ensaios de cristalização foram conduzidos com preparações contendo 3 mg/mL de RecX, valor máximo obtido sem a formação de precipitados (Figura 4.1F, linha 1).

#### 4.2.2.3 Cristalização da proteína RecX

A proteína RecX nativa foi submetida a diversas condições de cristalização utilizando a metodologia da gota sentada e da gota suspensa (seção 3.3.8). Os cristais obtidos variaram em forma e tamanho, além disso foram obtidos como cristais simples ou agrupados. Como controle negativo, as soluções do reservatório foram misturadas somente com o tampão de diluição da proteína (tampão A contendo glicerol 5%). Nessa condição, nenhum cristal foi visualizado após 2 meses de incubação. Para determinar a resolução, cinco cristais, do tipo agrupado ou simples, foram analisados quanto à capacidade de difratar raios X. Os espectros de raios X revelaram sinais fortes, distantes entre si e presentes apenas na área de alta resolução. Tais características são indicativas de um cristal de um composto iônico pequeno, já que o

mesmo apresenta uma unidade celular pequena e ordenada. A extensão do tempo de exposição do cristal não alterou o padrão de difração. Os cristais foram também analisados quanto à dureza e resistência à quebra, utilizando MicroTools (Hampton Research) e também quanto à capacidade de englobar azul de metileno (Izit dye – Hampton Research). Alguns dos cristais apresentaram características de cristais de proteína.

A alta tendência à precipitação apresentada pela proteína RecX limitou a concentração de proteína utilizada nos ensaios de cristalização, mas ao mesmo tempo sugere a tendência à agregação protéica. O desafio é identificar a condição em que a agregação protéica ocorra de maneira ordenada. Até o momento não foi descrita a obtenção de nenhum cristal da proteína RecX. O único modelo estrutural de RecX reportado foi produzido *in silico* utilizando o programa MODELLER e resultados de dicroísmo circular (Mishra *et al.*, 2003)

### 4.3 Ensaios *in vitro*

As proteínas RecA nativa, RecAHis, RecAHis L54Q, RecAHis L54Q G73A RecXHis e RecX nativa foram purificadas com grau de pureza de 94-98% e em concentração adequada para a determinação das suas atividades *in vitro*. As proteínas RecAHis, RecXHis, RecAHis L54Q e RecAHis L54Q G73A foram ensaiadas quanto às atividades de ligação ao DNA, ligação ao ATP, troca de fitas de DNA e hidrólise de ATP. Além disso, as proteínas RecAHis, RecA nativa, RecXHis e RecX nativa foram utilizadas nos ensaios de interação RecA-RecX. A concentração molar das proteínas foi calculada considerando-as na forma monomérica.



#### 4.3.1 Determinação da interação entre as proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae*

Como o gene *recX* de *H. seropedicae* encontra-se no mesmo operon do gene *recA* (Galvão, 2001; Galvão *et al.*, 2003), as proteínas RecX e RecA recém sintetizadas devem estar próximas favorecendo uma possível interação entre RecA e RecX. A interação das proteínas RecA e RecX foi determinada através de ensaios de imobilização em resina de sepharose ligada a íons  $\text{Ni}^{2+}$  e eletroforese bidimensional.

Para a determinação da interação RecA-RecX pelo método de imobilização de proteína em resina de sepharose ligada a íons  $\text{Ni}^{2+}$  (sepharose- $\text{Ni}^{2+}$ ) foram utilizadas as proteínas RecA e RecX com a cauda His e nas suas formas nativas. No ensaio apresentado na Figura 4.2 utilizou-se a proteína RecXHis purificada adsorvida a resina sepharose- $\text{Ni}^{2+}$  e a proteína RecA na sua forma nativa. Após a imobilização da proteína RecXHis na resina sepharose- $\text{Ni}^{2+}$ , a proteína RecA nativa foi adicionada (3.4.3.1). Em seguida, foi feita a lavagem da resina com tampão A contendo glicerol 5%, e a eluição da proteína RecXHis adsorvida à resina através da adição do mesmo tampão contendo 0,5 mol/L de imidazol. Se existisse interação entre RecX e RecA, as duas proteínas seriam eluídas nas mesmas frações. A eluição de RecXHis e RecA nativa após adição de imidazol 0,5 mol/L indicou a associação entre as duas proteínas (Figura 4.2A, linha 3). Um ensaio controle utilizando somente a resina sepharose- $\text{Ni}^{2+}$  mostrou que a proteína RecA nativa não é adsorvida (Figura 4.2B, linhas 5 e 6). A presença de ATP no sistema de reação contendo as duas proteínas não modificou a resposta, indicando que ATP não é importante para a interação entre as duas proteínas (Figura 4.2A, linha 4). Quando ssDNA 40 *mers* (80 nmol/L) foi adicionado juntamente com a proteína RecA nativa ao sistema contendo a proteína RecXHis imobilizada, não houve a formação do complexo RecA-RecX (Figura 4.2A, linha 5). Esse resultado sugere que a presença de ssDNA interfere na interação entre RecA e RecX, talvez porque a proteína RecA ao interagir com o ssDNA seja incapaz de interagir com RecX ou porque RecX ao interagir com o ssDNA torne-se incapaz de interagir com a RecA apesar da baixa concentração de DNA presente: a razão RecX:DNA nesse ensaio foi de 100:1 e RecA:DNA, 50:1. Em ambas as hipóteses a interação proteína-DNA deve ser mais forte que a interação proteína-proteína.

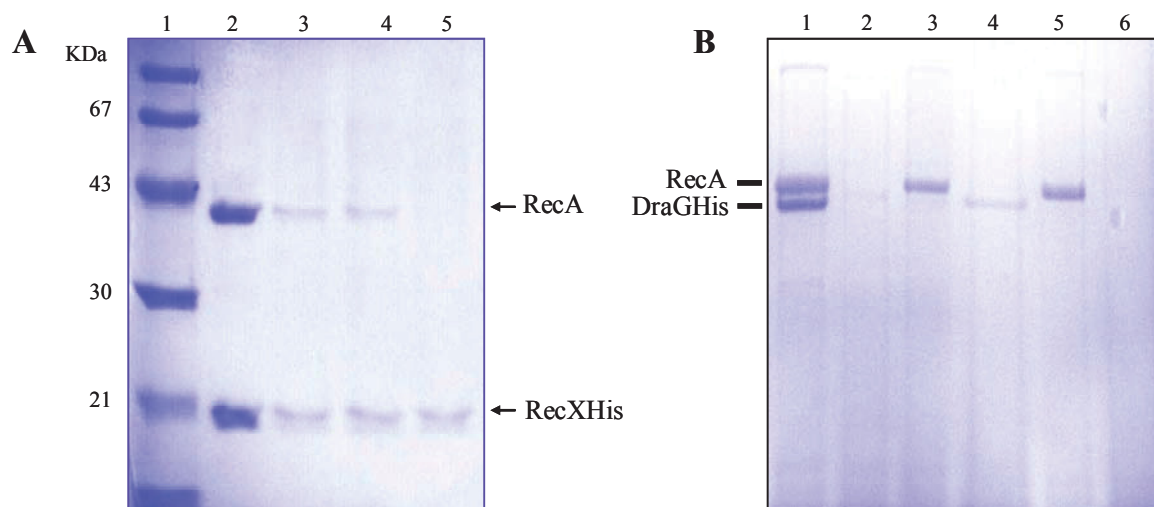
Experimentos semelhantes foram realizados adsorvendo a proteína RecAHis na resina sepharose ligada a íons  $\text{Ni}^{2+}$  e adicionando a proteína RecX nativa, obtendo-se os mesmos resultados (dados não mostrados). Como controles negativos, a proteína RecA nativa foi testada quanto à capacidade de ligar-se a outra proteína com a cauda His, mas não relacionada com a resposta SOS. A proteína utilizada foi a DraGHis de *Azospirillum brasilense*, envolvida no controle pós-traducional da nitrogenase (Ludden & Roberts, 1989). Não houve interação entre as duas proteínas (Figura 4.2B, linhas 1-4).

A interação das proteínas RecA e RecX também foi observada por eletroforese em duas dimensões. A primeira dimensão, desenvolvida em condições nativas, foi realizada em (1) gel de poliacrilamida 4% como descrito por Laemmli (1970) mas sem a adição de SDS, (2) gel de poliacrilamida 4,5% Tris-glicina, (3) gel de agarose 3%, ou (4) gel de agarose 0,5%.

Quando o gel de poliacrilamida em condições nativas foi utilizado e as proteínas reveladas com corante azul de Coomassie, não foi visualizada nenhuma banda correspondente à proteína RecX. Possivelmente devido ao seu alto pI (aproximadamente 10,1), a proteína RecX seja incapaz de migrar para o pólo positivo do gel. Nem a adição do análogo de ATP, o ADP-AlF<sub>4</sub>, e/ou ssDNA modificaram esse perfil. A proteína RecA, nessas condições, não migrou, possivelmente devido à formação de um agregado macromolecular, o filamento de RecA. Diante dessa limitação, a eletroforese em gel de agarose foi adotada na primeira dimensão.

Utilizando gel de agarose 3% em tampão TAE 1x (pH 8,0) para a primeira dimensão, observou-se que a proteína RecX permanece próxima ao poço de aplicação (Figura 4.3A, linha 1), enquanto a proteína RecA purificada apresenta migração: forma uma banda mais difusa se comparada a de RecX (Figura 4.3A linha 2). Quando as duas proteínas foram incubadas juntas e então submetidas à eletroforese em gel de agarose 3%, a banda correspondente a RecX diminuiu de intensidade, indicando uma possível interação entre as duas proteínas.

**FIGURA 4.2 - INTERAÇÃO RecA-RecX DE *H. seropedicae* DEMONSTRADA ATRAVÉS DE IMOBILIZAÇÃO EM RESINA DE SEPHAROSE-Ni<sup>2+</sup>**



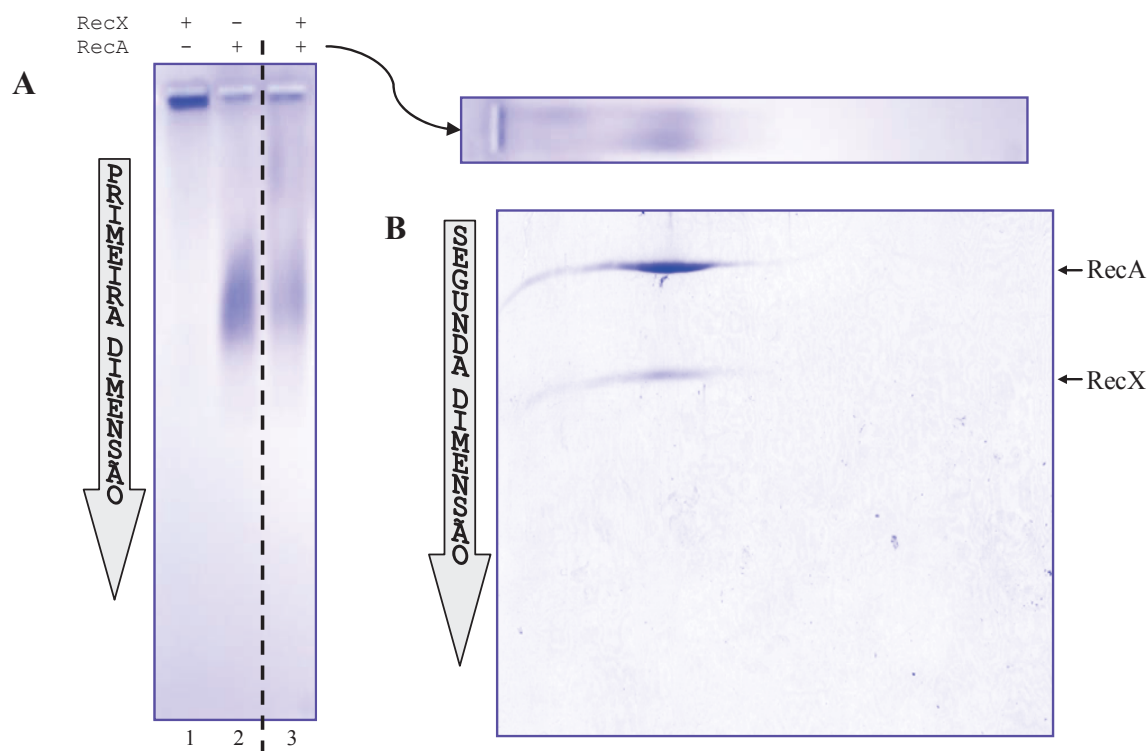
(A) A proteína RecXHis (8  $\mu\text{mol/L}$ ) foi em primeiro lugar adsorvida em resina sepharose-Ni<sup>2+</sup> e posteriormente a resina foi incubada na presença de RecA nativa (4  $\mu\text{mol/L}$ ). (B) Como controles, a proteína DraGHis (4  $\mu\text{mol/L}$ ) foi em primeiro lugar adsorvida em resina sepharose-Ni<sup>2+</sup> e posteriormente a resina foi incubada na presença de RecA nativa (4  $\mu\text{mol/L}$ ) ou a proteína RecA nativa (4  $\mu\text{mol/L}$ ) foi incubada diretamente com a resina. As amostras coletadas durante o ensaio foram analisadas por SDS-PAGE 12,5% após coloração com azul de Coomassie. (A) Linha 1: marcador de massa molecular; linha 2: RecA nativa (4,2  $\mu\text{g}$ ) e RecXHis (4,2  $\mu\text{g}$ ); linha 3: fração eluída do sistema RecXHis-sepharose-Ni<sup>2+</sup> após incubação com RecA nativa e adição de imidazol; linha 4: como na linha 3, mas na presença de 1 mmol/L de ATP; linha 5: como na linha 3, mas na presença de 88 nmol/L de ssDNA (40 mers). (B) Linha 1: DraGHis (4,2  $\mu\text{g}$ ) e RecA nativa (4,2  $\mu\text{g}$ ); linha 2: fração eluída após a incubação de DraGHis com a resina sepharose-Ni<sup>2+</sup>; linha 3: fração eluída após a adição de RecA nativa ao sistema DraGHis-sepharose-Ni<sup>2+</sup>; linha 4: fração eluída do sistema DraGHis-sepharose-Ni<sup>2+</sup> após incubação com RecA nativa e adição de imidazol; linha 5: RecA nativa (4,2  $\mu\text{g}$ ); linha 6: fração eluída do sistema contendo resina sepharose-Ni<sup>2+</sup> e RecA nativa, após a adição de imidazol.

Para confirmar a presença de um complexo co-migrando na altura da banda de RecA, a linha do gel foi recortada e a faixa central com 1 mm de espessura e com maior concentração das proteínas foi incubada com SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol durante 15 minutos, posicionada sobre um gel SDS-PAGE 12,5% preparado sem o gel de empilhamento ou pente com poços e submetida à eletroforese na segunda dimensão (seção 3.4.3.2). Após a revelação do gel com azul de Coomassie foi observado que as proteínas RecA e RecX encontravam-se alinhadas verticalmente (Figura 4.3B), indicando que as proteínas migraram juntas na eletroforese realizada em condições nativas. As amostras contendo apenas a proteína RecA ou RecX foram submetidas ao mesmo procedimento para confirmar a posição das proteínas na 2ª dimensão.

Uma vez confirmada a interação RecA-RecX por eletroforese bidimensional em gel de agarose 3% e SDS-PAGE 12,5%, uma variante metodológica dessa técnica foi testada para aprimorar e facilitar o ensaio. O gel de agarose 3% da primeira dimensão foi substituído pelo gel de agarose 0,5%, já que nessa concentração seria possível fundir as amostras (regiões de interesse do gel seccionadas após a eletroforese) e posteriormente analisar o conteúdo protéico por eletroforese desnaturante.

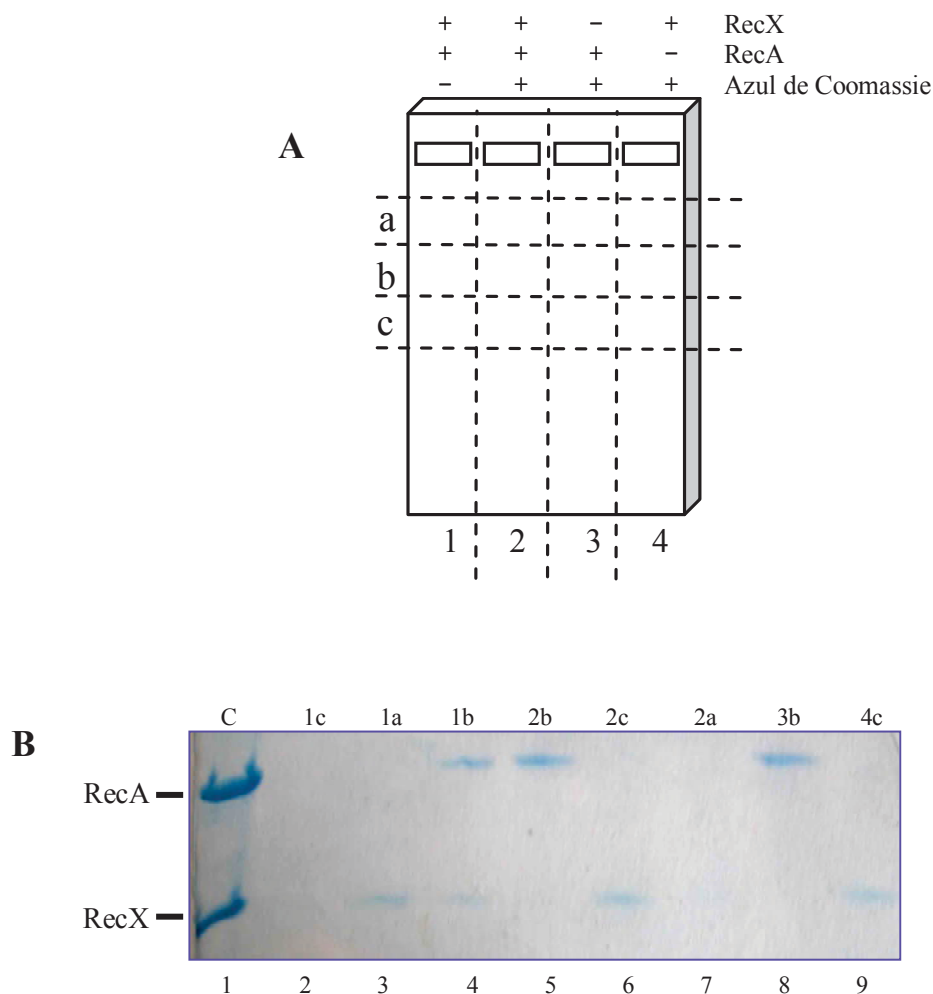
Após a realização da primeira dimensão em gel de agarose 0,5%, as linhas do gel foram isoladas e fatiadas transversalmente. As frações do gel foram identificadas por um número (1-4) e uma letra (a-c), de acordo com a sua posição vertical e horizontal, respectivamente, como esquematizado na figura 4.4A. A utilização de solução de azul de Coomassie (Tabela 3.3) para corar o gel de agarose após a corrida eletroforética, além de permitir a visualização das proteínas no gel ainda delimitou a área de corte dos cubos de agarose submetidos posteriormente à segunda dimensão.

**FIGURA 4.3 - DEMONSTRAÇÃO DA INTERAÇÃO RecA-RecX DE *H. seropedicae* ATRAVÉS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL - I**



As proteínas RecAHis e RecXHis foram incubadas conforme descrito na seção 3.4.3.2 e analisadas por eletroforese bidimensional. (A) Primeira dimensão: eletroforese em gel de agarose 3% em tampão TAE pH8,0. A linha 1 contém apenas a proteína RecX (23  $\mu\text{mol/L}$ ); a linha 2, a proteína RecA (7  $\mu\text{mol/L}$ ) e a linha 3, as proteínas RecA (4  $\mu\text{mol/L}$ ) e RecX (8  $\mu\text{mol/L}$ ). (+) indica presença e (-) ausência das proteínas indicadas. Após eletroforese, a linha 3 foi recortada (1 mm de espessura) e submetida à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% (segunda dimensão) (B). As posições das proteínas RecA e RecX estão indicadas. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie.

**FIGURA 4.4 - DEMONSTRAÇÃO DA INTERAÇÃO RecA-RecX DE *H. seropedicae* ATRAVÉS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL - II**



As proteínas RecAHis e RecXHis conforme descrito na seção 3.4.3.2 e analisadas por eletroforese bidimensional. (A) Ilustração da primeira dimensão: eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão TAE pH8,0. A linha 1 contém as proteínas RecA (4  $\mu\text{mol/L}$ ) e RecX (8  $\mu\text{mol/L}$ ); a linha 2, como na linha 1, mas na presença de azul de Coomassie G250 0,26% e as linhas 3 e 4 contém a proteína RecA (7  $\mu\text{mol/L}$ ) e RecX (23  $\mu\text{mol/L}$ ), respectivamente, ambas na presença de azul de Coomassie G250 0,26%. (+) indica presença e (-) ausência das proteínas indicadas. Após eletroforese, o gel foi fatiado como ilustrado em A e as regiões indicadas foram analisadas quanto ao seu conteúdo protéico por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% (segunda dimensão) (B). A linha 1 contém a proteína RecAHis (4,2  $\mu\text{g}$ ) e RecXHis (4,2  $\mu\text{g}$ ) purificadas e nas linhas 2-9, as amostras indicadas (numeração feita de acordo com a ilustração no painel A). As posições das proteínas RecA e RecX estão indicadas. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie.

Após a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE, foi possível visualizar a presença das proteínas RecA e RecX num mesmo cubo de agarose (Figura 4.4B, linha 4), indicando a co-migração das proteínas. A posição de migração do complexo RecA-RecX não foi coincidente com a posição de migração das proteínas RecA e RecX quando estas foram submetidas à eletroforese isoladamente, indicando que a co-migração das proteínas foi devido à interação entre elas e não devido à coincidência dos perfis de migração.

Schägger & Von Jagow (1991) descreveram uma metodologia de eletroforese nativa onde foi adicionado à amostra protéica azul de Coomassie G250. Esta molécula se liga à proteína, conferindo a ela carga negativa. Assim, foi adicionado 0,26% (p/v) de azul Coomassie G250 ao sistema de reação contendo as proteínas antes da eletroforese em gel de agarose 0,5%. A presença do corante nos sistemas de reação permitiu o monitoramento da migração das proteínas durante a eletroforese em gel de agarose 0,5%. Entretanto, após a excisão das regiões de interesse do gel da primeira dimensão e a análise por SDS-PAGE, não foi observada a co-migração das proteínas RecA e RecX quando o azul de Coomassie G250 foi adicionado ao sistema (Figura 4.4B, linha 5). Esses resultados contrastam com os resultados obtidos na ausência de azul de Coomassie G250, onde foi verificada a co-migração das proteínas RecA e RecX (Figura 4.4B, linha 4).

A inibição da formação do complexo RecA-RecX na presença de azul de Coomassie sugere que a interação entre as proteínas RecA e RecX é mediada por interações iônicas. A ligação do azul de Coomassie G250 às proteínas aparentemente induziu uma mudança das suas cargas inibindo a interação entre elas. Não se pode descartar a interferência física da molécula de azul de Coomassie no sistema, além da gerada devido a sua carga.

Todas as proteínas RecX identificadas apresentam alta proporção de resíduos básicos (Sano, 1993; Pàges *et al.*, 2003) enquanto as proteínas RecA apresentam alta proporção de resíduos ácidos no domínio C-terminal (Roca & Cox, 1997), que se encontra voltado para fora do filamento de RecA (Story *et al.*, 1992). Essas observações sugerem que a interação entre as proteínas RecA e RecX envolve interações iônicas.



A deleção de 17 aminoácidos da região C-terminal da proteína RecA de *E. coli* ou a substituição do resíduo de glutamato (-) na posição 343 por lisina (+) (resíduo presente na região C-terminal) reduz a capacidade de interação entre as proteínas RecA e RecX, indicando o envolvimento de interações iônicas na formação do complexo (Drees *et al.*, 2004b). O azul de Coomassie G250 parece competir com RecA pelas cargas positivas de RecX.

Os resultados mostrados confirmam que as proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae* interagem formando um complexo protéico. Este resultado é semelhante ao reportado para as proteínas RecA e RecX de *E. coli* e *M. tuberculosis* (Stohl *et al.*, 2003; Venkatesh *et al.*, 2002).

#### 4.3.2 Atividade de ligação das proteínas RecX e RecA ao DNA

Para determinar a capacidade de ligação das proteínas RecX e RecA de *H. seropedicae* ao DNA, foram realizados ensaios de retardamento de migração de banda de DNA. As proteínas RecAHis e RecXHis foram ensaiadas em presença de ssDNA de 88 *mers* ou dsDNA de 88 pb marcados com [<sup>32</sup>P]. Nesses ensaios, a interação proteína-DNA foi determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida e revelação em PhosphorImager e foi quantificada através da densitometria das bandas de DNA (seção 3.4.1.1). Além disso, a capacidade da proteína RecXHis de ligar-se ao DNA foi determinada utilizando o plasmídeo pTZ19R circular ou linear (2.871 pb) ou ainda na forma de ssDNA circular (2.871 *mers*). Nesse ensaio, a interação proteína-DNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (seção 3.4.1.2).

##### 4.3.2.1 Atividade de ligação ao DNA da proteína RecA

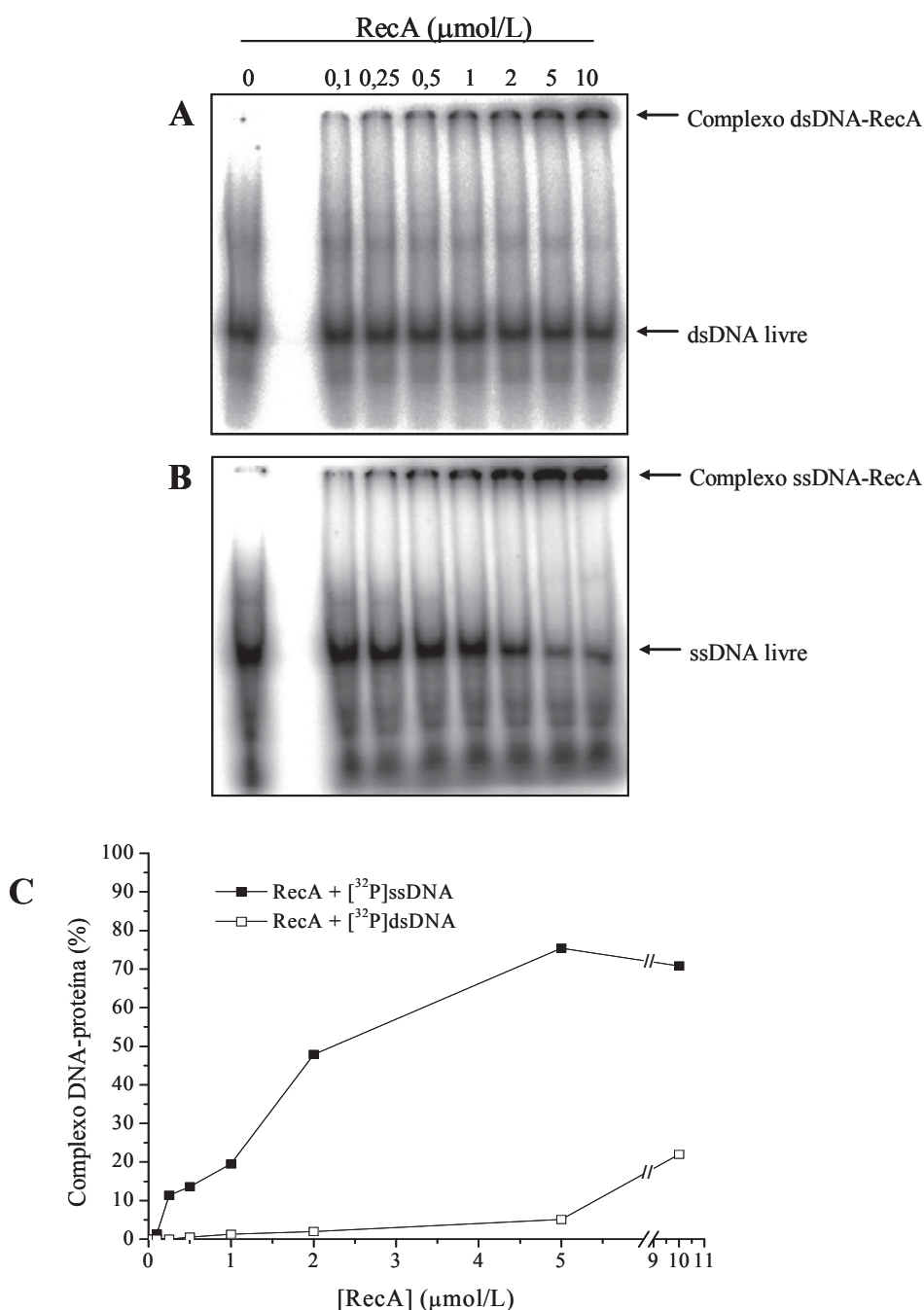
A proteína RecA de *H. seropedicae* (HsRecA) foi capaz de ligar tanto ssDNA quanto dsDNA, embora tenha apresentado maior afinidade de ligação ao ssDNA (Figura 4.5). O complexo proteína-ssDNA começou a ser visualizado com 0,25 µmol/L de proteína, enquanto na presença de dsDNA o complexo começa a ser

observado em 5  $\mu\text{mol/L}$  de RecA (Figura 4.5A e B). Na presença de 10  $\mu\text{mol/L}$  de RecA, cerca de 80% do dsDNA permaneceu livre, enquanto que cerca de 70% do ssDNA foi complexado (Figura 4.5C). A proteína RecA foi requerida na concentração de 2  $\mu\text{mol/L}$  para retardar 50% do ssDNA.

A proteína RecA de *E. coli* (EcRecA) foi capaz de ligar-se ao ssDNA, mas não ao dsDNA, na ausência de ATP ou análogos de ATP (McEntee *et al.*, 1981). O complexo EcRecA-dsDNA foi visualizado na ausência de ATP ou análogos somente em condições de pH abaixo de 6,0 (McEntee *et al.*, 1981). A proteína RecA de *H. seropedicae*, por outro lado, foi capaz de ligar-se ao dsDNA na ausência de ATP ou análogos de ATP em pH 7,5.

A proteína HsRecA formou um complexo macromolecular com o ssDNA ou dsDNA que se manteve no poço do gel. Mesmo com a diminuição da concentração do gel de poliacrilamida para 4%, esse complexo não migrou. Os complexos de alta massa molecular provavelmente são resultado da formação do filamento de RecA no ssDNA ou dsDNA em pH 7,5. Nessa condição ocorre nucleação lenta e extensão rápida do monômero da RecA de *E. coli* no ssDNA (Cox, 2003). Os filamentos formados apresentam alta massa molecular já que a cada três nucleotídeos ou pares de bases, há a ligação de uma molécula de RecA (Figura 2.3). Um complexo EcRecA-ssDNA estável que permanece no poço do gel de poliacrilamida foi observado previamente (Lusetti *et al.*, 2004a).

**FIGURA 4.5 - ENSAIO DE RETARDAMENTO DE MIGRAÇÃO DE DNA DE BAIXA MASSA MOLECULAR NA PRESENÇA DA PROTEÍNA RecA DE *H. seropedicae***



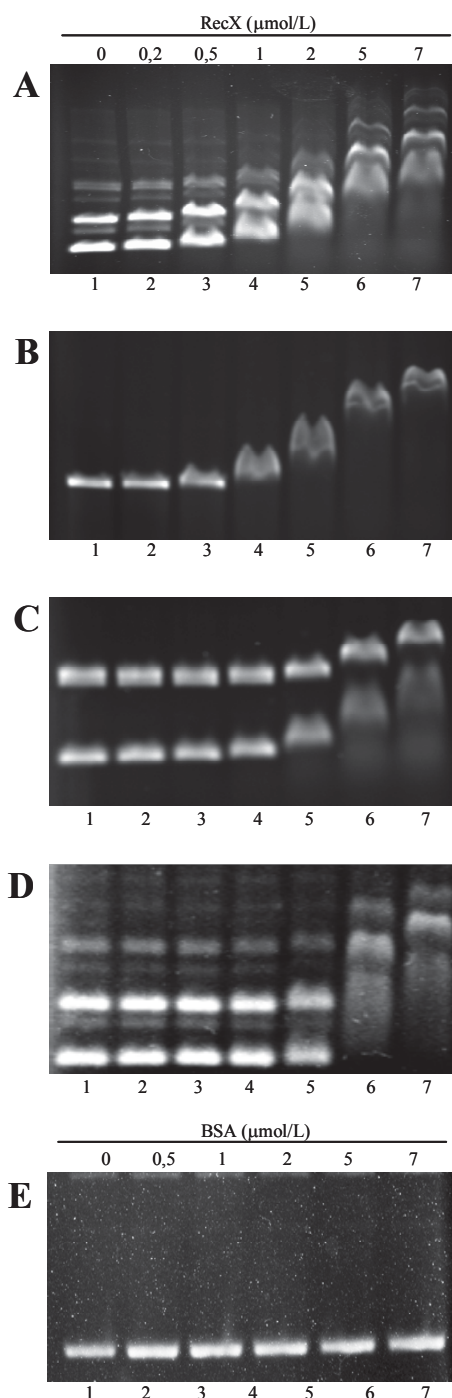
Retardamento de migração de DNA determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condição nativa (4,5%, a 60V por 80 min) conforme descrito na seção 3.4.1.1. A proteína RecAHis de *H. seropedicae* (nas concentrações indicadas) foi incubada na presença de 1,1  $\mu\text{mol/L}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-dsDNA 88 pb (A) ou 1,8  $\mu\text{mol/L}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-ssDNA 88 *mers* (B). Os géis foram secos e o material radioativo detectado em PhosphorImager. (C) Análise densitométrica de A e B. A figura mostra um resultado representativo.

#### 4.3.2.2 Atividade de ligação ao DNA da proteína RecX

A mutação no gene *recX* de *H. seropedicae* causou uma maior sensibilidade desse microrganismo à luz UV e ao metanosulfonato de metila, sugerindo que a função de RecA foi afetada (Galvão, 2001; Galvão *et al.*, 2003). Em outros microrganismos, tanto a mutação quanto a superexpressão de *recX* aparentemente modificaram a atividade de RecA (Sano, 1993; Papavinasasundaram *et al.*, 1998; Vierling *et al.*, 2000; Sukchawalit *et al.*, 2001; Stohl & Seifert, 2001; Stohl *et al.*, 2002; 2003). A ligação da proteína RecA de *E. coli* ao ssDNA formando o filamento de RecA é essencial para a função de RecA na recombinação homóloga, na resposta SOS e na mutagênese SOS (Schlacher *et al.*, 2005). Assim, um possível mecanismo de atuação de RecX poderia envolver ligação ao DNA, alterando a estrutura do filamento de RecA. A alta proporção de resíduos básicos (principalmente arginina), sugestiva de uma possível interação de RecX com DNA, suporta essa idéia. Além disso, recentemente, a modelagem *in silico* de RecX de *E. coli* (EcRecX) sugere a presença de um motivo de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice (Mishra *et al.*, 2003).

A capacidade da proteína RecX de *H. seropedicae* (HsRecX) de se ligar a diferentes tipos de DNA foi investigada inicialmente utilizando DNA não marcado e de alta massa molecular (seção 3.4.1.2). Os resultados utilizando o plasmídeo pTZ19R (2.871 pb) são apresentados na Figura 4.6, e mostram RecX formando um complexo de baixa mobilidade com dsDNA ou ssDNA. Aparentemente existe uma diferença de afinidade de ligação dependendo do tipo da molécula de DNA. No caso de moléculas de DNA dupla fita (circular ou linear), a formação do complexo foi observada em concentrações de RecX a partir de 0,5 µmol/L (Figura 4.6A e B). Entretanto, quando DNA simples-fita foi utilizado, o retardamento da migração só foi observado em concentrações superiores a 1 µmol/L (Figura 4.6C). Como controle, o ensaio foi repetido substituindo a proteína RecX por BSA, e nenhuma alteração na mobilidade do DNA foi observada (Figura 4.6E) indicando que o efeito observado foi devido à ligação de RecX às diversas formas de DNA.

**FIGURA 4.6 - ENSAIO DE RETARDAMENTO DE MIGRAÇÃO DE DNA DE ALTA MASSA MOLECULAR PELA PRESENÇA DA PROTEÍNA RecX DE *H. seropedicae***



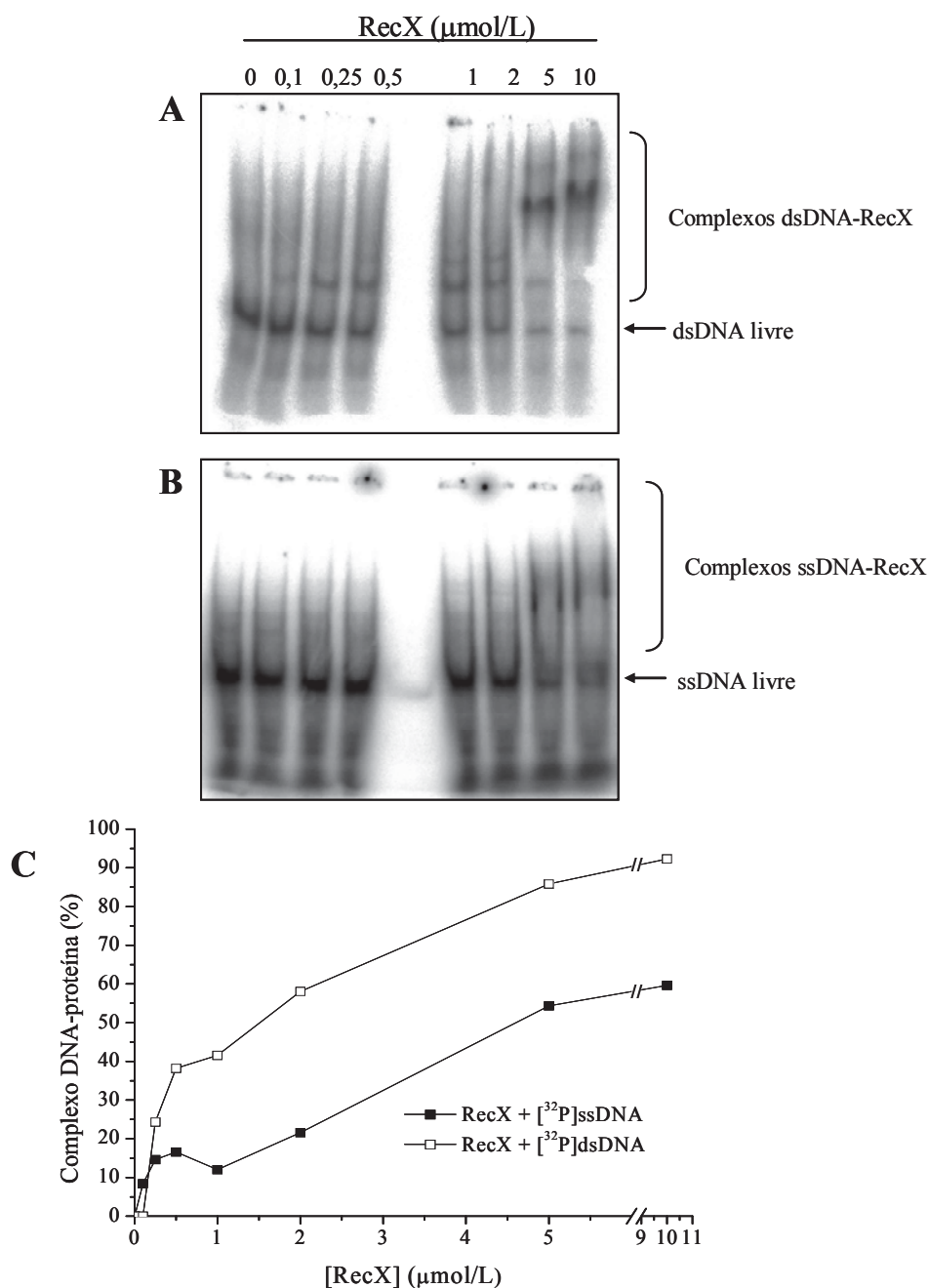
Retardamento de migração de DNA determinado por eletroforese em gel de agarose 0,5%, em tampão TAE pH8,0, corado com brometo de etídio (seção 3.4.1.2). A proteína RecXHis de *H. seropedicae* (nas concentrações indicadas) foi incubada na presença de 20 μmol/L de pTZ19R dsDNA circular (A), 8 μmol/L de pTZ19R dsDNA linear (B), 450 μmol/L de pTZ19R ssDNA circular (C) ou 20 μmol/L de pTZ19R dsDNA circular e 12 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> (D). RecX foi substituído por BSA nas mesmas condições do ensaio na presença de 8 μmol/L de pTZ19R dsDNA linear (E). Em (A) e (D), linha 1, as bandas presentes correspondem aos concatêmeros do vetor pTZ19R e em (C), linha 1, as bandas correspondem ao ssDNA circular do fago M13K07 (~8,7 kb) e ao ssDNA circular do vetor pTZ19R (~2,9 kb).

A atividade de ligação ao DNA parece ser controlada negativamente por cátions divalentes uma vez que a substituição de EDTA por  $\text{MgCl}_2$  (12 mmol/L) na mistura de reação diminuiu a afinidade aparente de RecX pelo DNA (Figura 4.6D). É possível que a ligação de íons magnésio pelos grupos fosfatos do DNA interfira negativamente na ligação de RecX ao DNA. Estes resultados são consistentes com o fato de que a proteína RecX apresenta um alto pI (aproximadamente 10,1), o que sugere que a interação entre RecX e o DNA seja mediada pelos fosfatos do DNA e os resíduos positivamente carregados da proteína RecX. Drees et al. (2004b) mostraram que altas concentrações de  $\text{Mg}^{2+}$  favorecem a interação RecA-RecX de *E. coli*. Estas evidências sugerem que os íons  $\text{Mg}^{2+}$  favorecem a interação de RecX com RecA desfavorecendo a ligação RecX com o DNA.

Para uma análise mais detalhada, ensaios de retardamento de migração eletroforética foram realizados utilizando como DNA alvo os polinucleotídeos ssDNA (88 *mers*) ou dsDNA (88 bp) marcados com [ $^{32}\text{P}$ ] (3.4.1.1). Semelhante ao resultado anterior, a proteína RecX foi capaz de ligar tanto ssDNA como dsDNA (Figura 4.7). A quantidade mínima de RecX necessária para a visualização da formação do complexo de migração retardada RecX-dsDNA foi de 0,25  $\mu\text{mol/L}$ , e para a visualização do complexo RecX-ssDNA, 2  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 4.7A e B, respectivamente). A diferença de afinidade entre dsDNA e ssDNA ficou ainda mais evidente em concentrações superiores de RecX: na concentração de 10  $\mu\text{mol/L}$  de RecX, 40% do ssDNA e apenas 8% do dsDNA foram encontrados na forma livre (Figura 4.7C).

Estes resultados mostram que independentemente da massa molecular do DNA alvo, a proteína RecX é capaz de se ligar mais eficientemente ao dsDNA do que ao ssDNA (Figuras 4.6 e 4.7). A proteína RecA, por outro lado, apresentou maior afinidade pelo ssDNA (Figura 4.5C). As concentrações de RecX necessárias para retardar 50% do dsDNA e ssDNA foram 1,5  $\mu\text{mol/L}$  e 4,2  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente.

**FIGURA 4.7 - ENSAIO DE RETARDAMENTO DE MIGRAÇÃO DE DNA DE BAIXA MASSA MOLECULAR PELA PRESENÇA DA PROTEÍNA RecX DE *H. seropedicae***



Retardamento de migração de DNA determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condição nativa (4,5%, a 60V por 80 min) conforme descrito na seção 3.4.1.1. A proteína RecXHis de *H. seropedicae* (nas concentrações indicadas) foi incubada na presença de 1,1  $\mu\text{mol/L}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-dsDNA 88 pb (A) ou 1,8  $\mu\text{mol/L}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-ssDNA 88 *mers* (B). A seta indica a banda corresponde ao DNA livre. Os géis foram secos e o material radioativo detectado em PhosphorImager. (C) Análise densitométrica de A e B. A figura mostra um resultado representativo.



A análise dos géis permitiu ainda observar que com o aumento da concentração de RecX ocorreu a formação de múltiplas bandas de retardamento. É possível que essas bandas representem complexos RecX:DNA de diferentes estequiometrias (Figura 4.7A). A adição de 5 ou 10  $\mu\text{mol/L}$  de RecX causou a formação de uma banda difusa e mais próxima do poço do gel. O complexo RecX-ssDNA (Figura 4.7B) apresentou características distintas das apresentadas pelo complexo RecX-dsDNA. Na presença de ssDNA, não há a formação de bandas definidas mas ocorre a formação de uma banda difusa que se estende da banda de DNA livre até o topo do gel. Essas diferenças sugerem que os complexos RecX-dsDNA e RecX-ssDNA têm estruturas distintas.

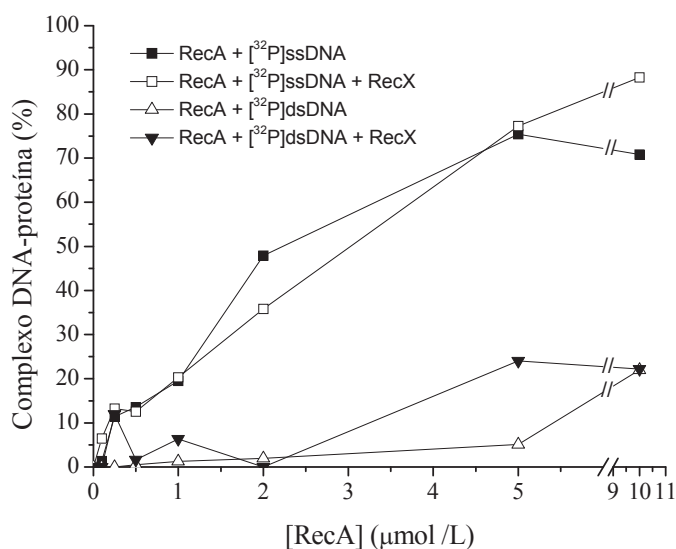
Os resultados indicam que a proteína RecX de *H. seropedicae* foi capaz de se ligar a DNA em concentrações mais baixas do que aquelas reportadas para a RecX de outros organismos. Enquanto a proteína de *H. seropedicae* foi capaz de ligar ao DNA em concentrações de 0,25  $\mu\text{mol/L}$ , a proteína RecX de *E. coli* foi capaz de ligar-se ao ssDNA ou dsDNA somente em concentrações acima de 1  $\mu\text{mol/L}$  (Stohl *et al.*, 2003; Drees *et al.*, 2004a). A proteína RecX de *M. tuberculosis* não apresentou atividade de ligação ao ssDNA ou dsDNA linear (Venkatesh *et al.*, 2002).

#### 4.3.2.3 Efeito de RecX sobre a atividade de ligação ao DNA da proteína RecA

Para determinar a influência da presença de RecX na ligação de RecA ao DNA, foram conduzidos experimentos na presença das duas proteínas e de dsDNA 88 pb ou ssDNA 88 *mers* marcados com [ $^{32}\text{P}$ ]. Nesses experimentos, a concentração da proteína RecX foi mantida constante (0,25  $\mu\text{mol/L}$ ) e a concentração de RecA variável. Os resultados são apresentados na Figura 4.8. As percentagens de DNA livre foram determinadas em relação à quantidade observada na ausência de RecA.

A presença da proteína RecX não modificou o padrão de retardamento de migração eletroforética dos complexos dsDNA- ou ssDNA-RecA quando presente em uma relação molar RecA:RecX de 1:1 até 40:1 (Figura 4.8).

**FIGURA 4.8 - EFEITO DA PROTEÍNA RecX SOBRE A ATIVIDADE DE LIGAÇÃO AO DNA DA PROTEÍNA RecA.**



Retardamento de migração eletroforética de DNA em gel de poliacrilamida em condição nativa (4,5%, a 60V por 88 min) conforme descrito na seção 3.4.1.1. Foram utilizados nos ensaios 1,1 μmol/L de [<sup>32</sup>P]-dsDNA (88 bp) e 1,8 μmol/L de [<sup>32</sup>P]-ssDNA (88 *mers*). A proteína RecAHis foi incubada na ausência ou presença de 250 nmol/L de RecXHis. Os géis foram secos e o material radioativo detectado em PhosphorImager. A percentagem de DNA livre foi determinada por densitometria dos géis. Nos ensaios realizados na ausência de RecX, o valor de 100% de DNA livre foi obtido a partir da reação realizada na ausência de proteína e naqueles ensaios realizados na presença de RecX, o valor de 100% de DNA livre foi obtido a partir da reação realizada na presença de RecX e ausência de RecA.

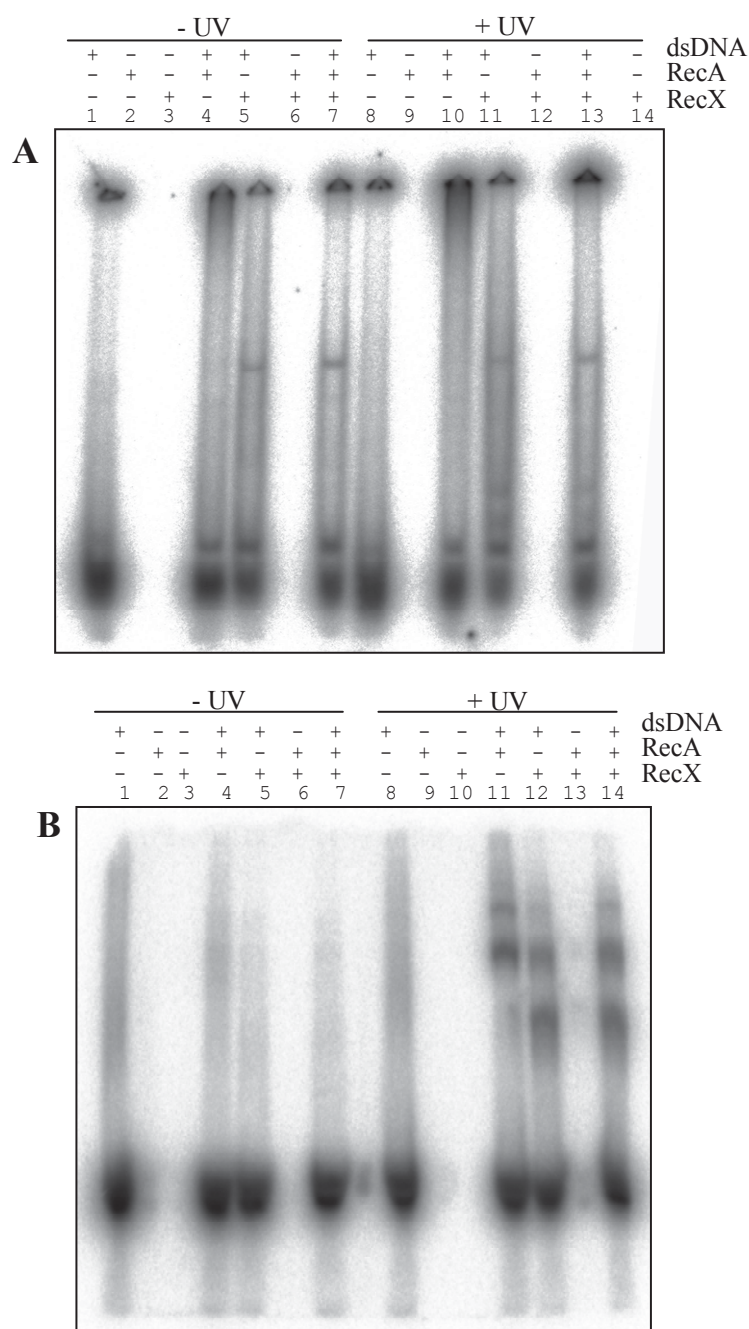
Para determinar se ambas as proteínas fazem contato com o dsDNA no complexo ternário RecA-RecX-dsDNA ou se a associação de RecX ocorre exclusivamente por interação com RecA, como sugerido por Drees *et al.* (2004a, b) e Lusetti *et al.* (2004b), foram realizados experimentos de formação de ligação covalente induzida pela luz UV (*photo-crosslinking*).

As proteínas RecX e RecA foram incubadas com o dsDNA (63 pb) derivatizado com brometo de azidofenacil e marcado com [<sup>32</sup>P] (Apêndice A) em pH 8,0, na ausência de ATP ou análogos de ATP (3.4.2). Os experimentos foram realizados em duplicata e submetidos ou não à luz UV (365 nm). O produto das reações foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condição nativa ou desnaturante (SDS-PAGE).

Após a corrida eletroforética das amostras em gel de poliacrilamida sob condição nativa foi possível visualizar o aparecimento de bandas com migração eletroforética reduzida daquela apresentada pelo DNA livre nas reações submetidas ou não à luz UV, indicando a formação de complexos proteína-DNA (Figura 4.9A). Quando somente a proteína RecA estava presente foi possível visualizar a formação do complexo DNA-RecA que se mantém no poço do gel (Figura 4.9A, linhas 4 e 10). Na presença de RecX, várias bandas foram observadas (Figura 4.9B, linhas 5 e 11). Quando ambas as proteínas estavam presentes, bandas de migração idêntica às aquelas observadas na condição em que apenas a proteína RecX encontrava-se presente foram observadas (Figura 4.9B, linha 7 e 13). Esses resultados indicam que mesmo na presença de RecA, RecX ainda liga-se ao dsDNA nas condições utilizadas (5 µmol/L de RecX em pH 8,0).

A eletroforese em condição desnaturante dos produtos de reação revelou bandas de migração retardada correspondentes aos produtos de ligação DNA-proteína somente após a exposição à luz UV (Figura 4.9B, linhas 11, 12 e 14), confirmando a efetivação da ligação covalente entre as moléculas de DNA e proteína.

**FIGURA 4.9 - LIGAÇÃO COVALENTE DA PROTEÍNA RecA E/OU RecX DE *H. seropedicae* AO dsDNA DERIVATIZADO.**



As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condição nativa (4,5%, a 60V por 100 min) (A) ou em condição desnaturante (12,5% SDS-PAGE a 200V por 40 min) (B). Ambos os géis foram secos e o material radioativo detectado em PhosphorImager. As proteínas RecAHis e RecXHis de *H. seropedicae* foram incubadas na concentração de 5  $\mu\text{mol/L}$  com 0,8  $\mu\text{mol/L}$  de dsDNA (63 pb) conjugado com brometo de azidofenacil e marcado com  $[^{32}\text{P}]$ . As linhas 1 a 7 não foram expostas à luz UV e as linhas 8 a 14 foram expostas por 30 segundos à luz UV (365 nm) para a formação da ligação covalente (*crosslinking*).

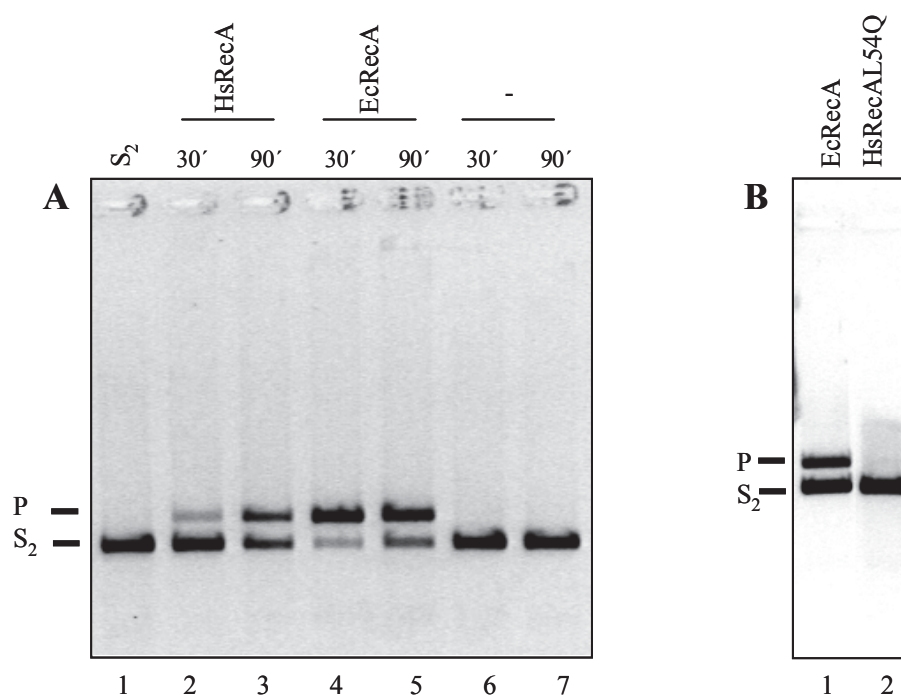
### 4.3.3 Troca de fitas de DNA mediada pela proteína RecA

A capacidade de promoção de troca de fitas de DNA da proteína RecA de *H. seropedicae* (HsRecA) foi determinada em pH 7,5 a 37°C (seção 3.4.4). Na reação de troca de fitas de DNA, o ssDNA  $\phi$ X174 circular ( $S_1$ ) e o dsDNA  $\phi$ X174 linear homólogo ( $S_2$ ) são recombinados para formar uma molécula de dsDNA circular aberta (P) e uma molécula de ssDNA linear. As condições do ensaio foram padronizadas utilizando a proteína RecA de *E. coli* (EcRecA; GE Healthcare) já que essa proteína foi previamente caracterizada em diversas condições e por diversos grupos de pesquisa (Drees *et al.*, 2004a, b; Lusetti *et al.*, 2004a, b).

A proteína HsRecA foi capaz de promover a troca de fitas entre duas seqüências homólogas de DNA (Figura 4.10). Após 30 minutos de reação foi possível visualizar a formação da banda do produto de reação, que se tornou mais intensa com a extensão do tempo de incubação (Figura 4.10A, linhas 2 e 3). Mesmo após ser estocada por 10 dias a -20°C, a proteína HsRecA manteve sua atividade de troca de fitas (resultado não mostrado). A atividade da proteína EcRecA foi ensaiada como controle positivo (Figura 4.10A, linhas 4 e 5). Baseando-se na intensidade da banda do produto, foi possível verificar que a proteína EcRecA foi mais eficiente do que a proteína HsRecA no processo de troca de fitas de DNA. Como controle negativo, o sistema de reação sem proteína foi submetido às mesmas condições de incubação. Como resultado, nenhum produto de recombinação foi formado (Figura 4.10A, linhas 6 e 7). A proteína RecA de *M. tuberculosis* também não foi capaz de atingir os mesmos níveis de formação do DNA heteroduplex comparativamente com a proteína RecA de *E. coli* nas mesmas condições de ensaio (Venkatesh *et al.*, 2002).

A proteína RecAHis L54Q (Figura 4.10B, linha 2) não foi capaz de catalisar a troca de fitas entre moléculas de ssDNA circular e dsDNA linear e formar dsDNA circular, indicando que o resíduo de leucina 54 é importante para a atividade de troca de fitas de DNA.

**FIGURA 4.10 - TROCA DE FITAS DE DNA MEDIADA PELAS PROTEÍNAS RecA DE *H. seropedicae* E *E. coli*.**



Ensaio de troca de fitas entre DNAs homólogos realizado utilizando 6,7  $\mu\text{mol/L}$  da proteína RecAHis ou RecAHis mutante L54Q de *H. seropedicae*, ou RecA de *E. coli* (conforme indicado); 22,6  $\mu\text{mol/L}$  ssDNA  $\phi\text{X174}$  circular e 15,6  $\mu\text{mol/L}$  dsDNA  $\phi\text{X174}$  linear, nas condições descritas na seção 3.4.4. As reações foram incubadas por 30 ou 90 minutos a 37°C (A) ou por 90 minutos (B). Após incubação as amostras foram extraídas com fenol equilibrado e SDS e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x, desenvolvida a 3,6 V/cm por 5 horas. O DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídeo e exposição à luz UV. S<sub>2</sub> indica dsDNA  $\phi\text{X174}$  linear; P,  $\phi\text{X174}$  dsDNA circular, (-) ausência de proteína; HsRecA, RecA de *H. seropedicae*; HsRecA L54Q, RecA mutante L54Q de *H. seropedicae*; EcRecA, RecA de *E. coli* (GE Healthcare).

O resíduo mutagenizado L54 (corresponde ao resíduo L47 em *E. coli*, Apêndice C), encontra-se conservado em 61 de 64 proteínas RecA bacterianas comparadas (Roca & Cox, 1997), entretanto nenhum estudo de substituição deste resíduo foi reportado. Esse resíduo faz parte do grupo dos resíduos não polares presentes no motivo MAW (Figura 2.11), o qual juntamente com os resíduos L51, I61 e I64 fazem parte do núcleo hidrofóbico da proteína RecA (Story *et al.*, 1992). No mutante HsRecA L54Q, o resíduo hidrofóbico de leucina foi substituído por um resíduo hidrofílico de glutamina. As proteínas RecA das 3 espécies de bactérias (*Mycoplasma pulmonis*, *Myxococcus xanthus* e *Thermotoga maritima*) que não possuem o resíduo de leucina conservado na posição 47, apresentam uma substituição por um aminoácido também hidrofóbico: isoleucina ou valina (Roca & Cox, 1997).

A substituição R60C, outro resíduo presente no motivo MAW, na proteína EcRecA, tornou a proteína também incapaz de realizar a troca de fitas de DNA (Lauder & Kowalczykowski, 1993). Uma vez que esse motivo está envolvido na comunicação entre monômeros (Roca & Cox, 1997), estes resultados sugerem a substituição L54Q poderia estar interferindo no processo de transdução de sinal entre monômeros.

#### 4.3.3.1 Efeito da proteína RecX sobre a troca de fitas de DNA mediada pela proteína RecA

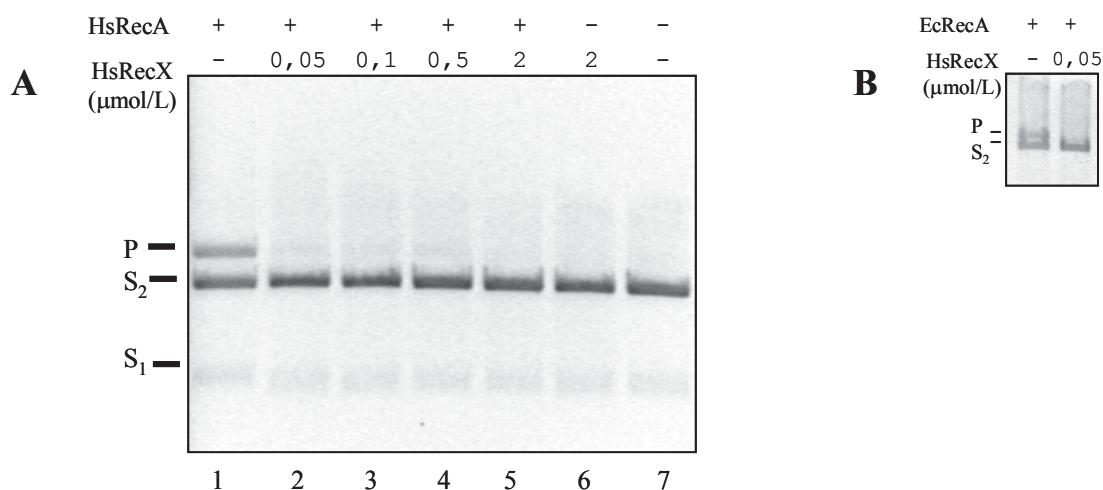
A reação de troca de fitas de DNA realizada por RecA foi examinada na presença de concentrações crescentes de RecX (Figura 4.11). Uma redução de cerca de 90% na quantidade de produto de recombinação foi observada ao adicionar 50 nmol/L de RecX (Figura 4.11A, linha 2). O aumento da concentração de RecX para 2  $\mu$ mol/L, eliminou completamente a reação de troca de fitas (Figura 4.11A, linha 4). A proteína RecX de *H. seropedicae* também foi capaz de inibir a atividade de troca de fitas catalisada pela proteína RecA de *E. coli* (Figura 4.11B). Esses resultados mostraram que a proteína RecX de *H. seropedicae*, em concentrações sub-estequiométricas, foi capaz de inibir a atividade de troca de fitas de DNA mediada por RecA em concentrações limitantes de DNA. Além disso, foi possível concluir que a proteína



RecX não precisa interagir com cada monômero do filamento de RecA para inibir a troca de fitas na recombinação homóloga.

A proteína RecA de *M. tuberculosis* num sistema homólogo foi inibida completamente na presença de 250 nmol/L de RecX (Venkatesh *et al.*, 2002) e a proteína RecX de *E. coli* foi necessária em concentrações estequiométricas em relação a RecA para inibir a sua atividade de troca de fitas (Drees *et al.*, 2004a).

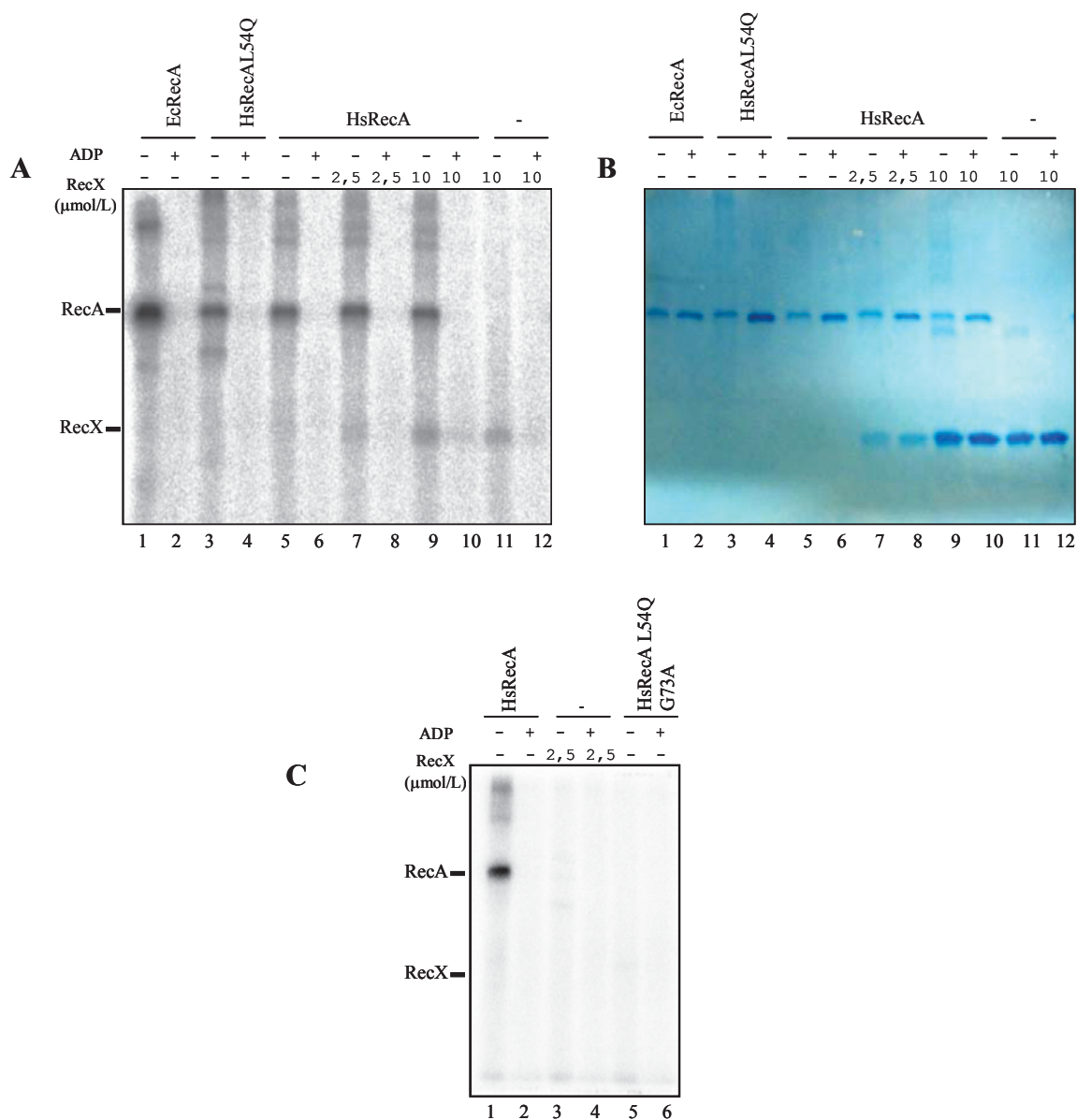
**FIGURA 4.11 - EFEITO DA PROTEÍNA RecX NA TROCA DE FITAS MEDIADA PELA PROTEÍNA RecA.**



O efeito da proteína RecX na troca de fitas de DNA mediada pela proteína RecA de *H. seropedicae* (A) ou RecA de *E. coli* (B) foi determinado conforme descrito na seção 3.4.4. O sistema continha 6,7 μmol/L de RecAHis de *H. seropedicae* (HsRecA) ou de *E. coli* (EcRecA) e as concentrações indicadas de RecXHis (HsRecX, em μmol/L) na presença de 22,6 μmol/L ssDNA φX174 circular e 15,6 μmol/L dsDNA φX174 linear, e foi incubado por 90 min a 37°C. Após extração com fenol equilibrado e SDS, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x, desenvolvida a 3,6 V/cm por 5 horas. O DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídeo e exposição à luz UV. S<sub>2</sub> indica dsDNA φX174 linear; S<sub>1</sub> indica ssDNA φX174 circular; P, φX174 dsDNA circular; (+); presença de proteína; (-) ausência de proteína.

#### 4.3.4 Atividade de ligação ao ATP da proteína RecA

A capacidade de ligação ao ATP das proteínas RecA, RecA mutante L54Q ou RecA mutante L54Q G73A foi avaliada em presença de ssDNA  $\phi$ X174 circular e [ $\alpha^{32}$ P]ATP após exposição à luz UV (254 nm) e eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (seção 3.4.5). A proteína EcRecA (GE Healthcare) mais uma vez serviu de controle positivo. Ao fazer a correspondência entre sinais obtidos após a revelação no PhosphorImager (Figura 4.12A) e a posição das proteínas no gel desnaturante (Figura 4.12B) foi possível verificar a formação da ligação proteína-ATP. Na linha 1A foi visualizado um sinal correspondente a EcRecA ligada covalentemente ao ATP. Esse sinal desapareceu com a adição de ADP não marcado antes da exposição à luz UV (Figura 4.12A, linha 2), indicando que a ligação entre RecA e ATP foi específica. Um resultado semelhante foi obtido com a proteína RecA de *H. seropedicae* (Figura 4.12A, linhas 5 e 6). Além disso, a proteína RecA mutante L54Q foi capaz de ligar ATP, conforme indicado pela formação da ligação covalente com ATP após a exposição à luz UV (Figura 4.12 A, linha 3). A formação do produto de ligação ATP-RecA L54Q em intensidade similar ao da proteína HsRecA (Figura 4.12A, linhas 5 e 6) só ocorreu na ausência de ADP, indicando a especificidade dessa interação. Esta observação mostra que a ligação de ATP não foi afetada pela mutação no resíduo de leucina 54, indicando que esse resíduo não está envolvido na ligação do ATP. Por outro lado, a proteína HsRecA G73A L54Q foi incapaz de ligar ATP (Figura 4.12C, linhas 5 e 6). O resíduo G73 da proteína HsRecA corresponde ao resíduo G66 da EcRecA (Apêndice C) presente no motivo Walker A e é conservado em todas as proteínas RecA de sequência conhecida (Roca & Cox, 1997). Esse resíduo é essencial para a atividade de RecA, já que qualquer substituição nessa posição produz proteínas RecAs incapazes de ligar ATP (Konola *et al.*, 1994; Roca & Cox, 1997). A ausência de ligação da proteína RecA mutante L54Q G73A confirmou que a formação do produto de adição entre ATP e RecA ou RecA L54Q não foi resultado de uma associação inespecífica.

FIGURA 4.12 - LIGAÇÃO AO ATP DA PROTEÍNA RecA DE *H. seropedicae*

A capacidade da proteína RecA em ligar ATP foi determinada conforme descrito na seção 3.4.5. As proteínas RecA de *E. coli*, RecAHis ou RecA mutante L54Q ou L54Q G73A de *H. seropedicae* na concentração de 2,5 μmol/L e a proteína RecXHis na concentração de 2,5 ou 10 μmol/L (conforme indicado) foram expostas à luz UV por 20 minutos na presença de 6,5 μmol/L ssDNA φX174 circular e 37 kBq [ $\alpha^{32}$ P]ATP. (+) indica presença e (-) ausência de 4 mmol/L ADP no sistema. (A) e (C) correspondem à imagem obtida pelo PhosphorImager do material marcado radioativamente e separado em gel SDS-PAGE 12,5%. (B) corresponde ao gel de A corado com azul de Coomassie. EcRecA, RecA de *E. coli*; HsRecA, RecAHis de *H. seropedicae*; HsRecAL54Q, RecAHis mutante L54Q de *H. seropedicae*; HsRecA L54Q G73A, RecAHis mutante L54Q G73A de *H. seropedicae*.

#### 4.3.4.1 Efeito da proteína RecX na atividade de ligação ao ATP da proteína RecA

Para verificar uma possível influência da proteína RecX na atividade de ligação ao ATP por RecA, a proteína HsRecA foi incubada com ATP marcado com [ $^{32}\text{P}$ ] na presença de RecX. A quantidade de produto de adição de ATP com proteína HsRecA não foi alterada na presença de 2,5 e 10  $\mu\text{mol/L}$  de RecX (Figura 4.12A, linhas 5, 7, 9), indicando que RecX não interfere na capacidade de ligação ao ATP da proteína HsRecA. Em alta concentração de RecX (10  $\mu\text{mol/L}$ ), foi observada uma banda radioativa fraca na altura de RecX sugerindo a marcação dessa proteína por [ $^{32}\text{P}$ ]ATP (Figura 4.12A, linha 11). Entretanto, quando a concentração de RecX usada foi a mesma utilizada que a da proteína RecA (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ), nenhum sinal de ligação ao ATP foi observado (Figura 4.12C, linha 4). Aparentemente, a alta concentração protéica induziu a ligação inespecífica do ATP à proteína RecX. A banda presente apenas nas linhas do gel onde a proteína RecX foi ensaiada na concentração de 10  $\mu\text{mol/L}$  na presença (Figura 4.12B, linha 9) ou ausência da proteína RecA (Figura 4.12B, linha 11) apresenta massa molecular correspondente à proteína RecX na sua forma dimérica.

Estes resultados permitem sugerir que a proteína RecA de *H. seropedicae* liga-se especificamente ao ATP e que a presença da proteína RecX não afeta essa ligação. Esses resultados concordam com o que foi reportado para as proteínas de *M. tuberculosis*: a proteína RecX desse microrganismo mostrou-se incapaz de ligar ATP ou de inibir a ligação do ATP à proteína RecA (Venkatesh *et al.*, 2002).

### 4.3.5 Atividade de hidrólise de ATP (ATPásica)

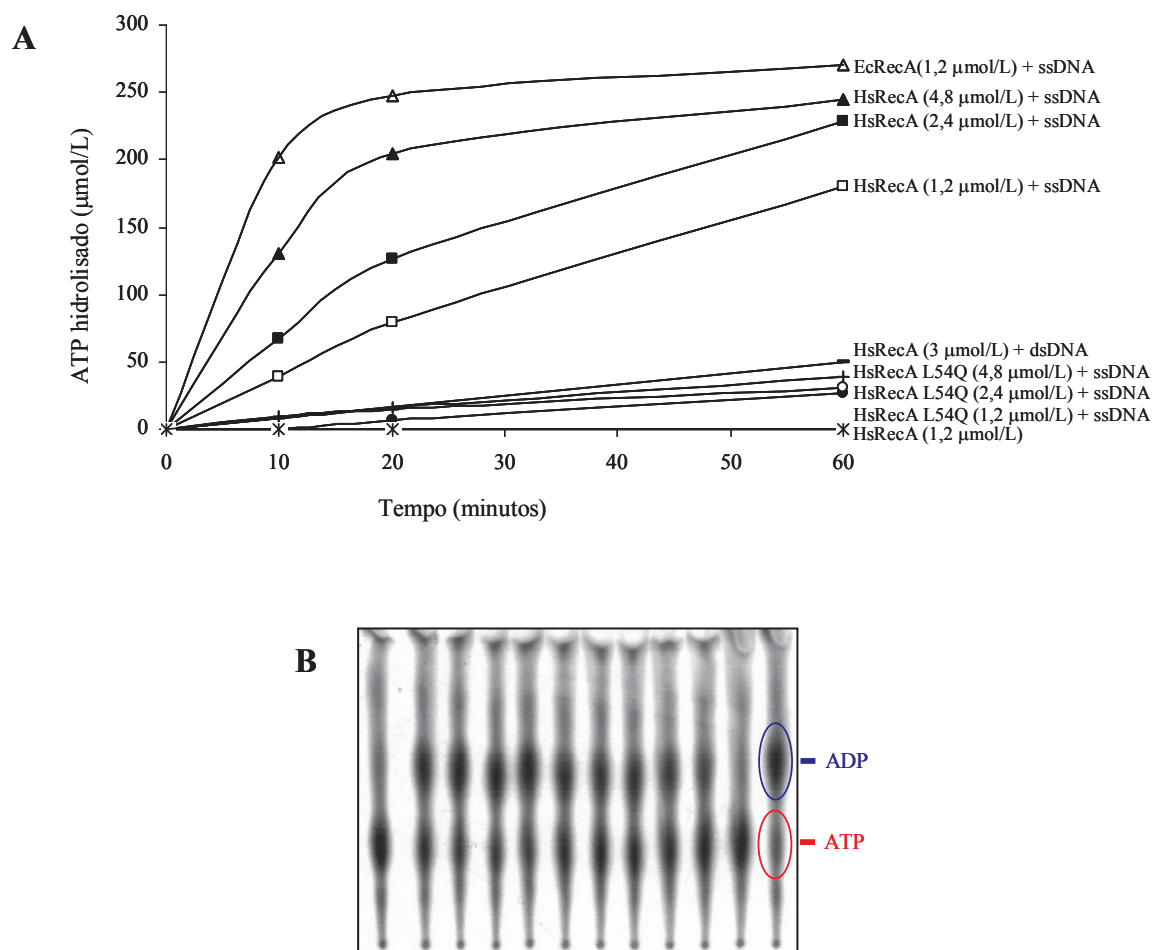
#### 4.3.5.1 Atividade ATPásica da proteína RecA

A proteína RecA de *E. coli* apresenta atividade de hidrólise de ATP dependente de DNA (Roca & Cox, 1997). Essa atividade de RecA tem sido utilizada como um indicador do nível de RecA ligada ao DNA, uma vez que a taxa de hidrólise de ATP é diretamente proporcional à quantidade de monômeros de RecA ligados ao

DNA na ausência de qualquer agente que altere a atividade ATPásica intrínseca de RecA (Drees *et al.*, 2004a, b; Cox, 2003; Roca & Cox, 1997; Shan *et al.*, 1997; Lindsley & Cox, 1989, 1990; Arenson *et al.*, 1999).

O ssDNA  $\phi$ X174 circular (44  $\mu$ mol/L) foi usado para a formação do filamento de RecA, uma vez que a proteína HsRecA não apresentou atividade ATPásica na ausência de DNA ou na presença de dsDNA  $\phi$ X174 linear (10  $\mu$ mol/L) em pH 7,5 (Figura 4.13). Esses resultados concordam com os reportados para a proteína RecA de *E. coli*. A EcRecA apresenta uma atividade ATPásica independente de ssDNA muito baixa e não apresenta atividade ATPásica dependente de dsDNA em pH 7,5 (Weinstock *et al.*, 1981). Além disso, foi mostrado que a atividade ATPásica dependente de ssDNA da EcRecA se mantém alta e estável numa faixa ampla de pH entre 6 e 9 (Weinstock *et al.*, 1981).

A concentração padrão de RecA usada nos ensaios de atividade ATPásica foi estabelecida após a realização de uma curva de concentração da proteína HsRecA, na qual foram utilizadas as concentrações de 1,2, 2,4 ou 4,8  $\mu$ mol/L (seção 3.4.6). No tempo zero de todos os experimentos foram adicionados o [ $^{32}$ P]ATP e a proteína SSB ao sistema. Como controle positivo, foi utilizada a proteína RecA de *E. coli* (GE Healthcare).

FIGURA 4.13 - ATIVIDADE ATPÁSICA DA PROTEÍNA RecA DE *H. seropedicae*

(A) A atividade de ATPase da proteína RecA foi ensaiada conforme descrito na seção 3.5.6. Foram utilizadas as proteínas RecA de *E. coli* (EcRecA) na concentração de 1,2  $\mu\text{mol/L}$  e a RecAHis (HsRecA) e a RecAHis mutante L54Q (HsRecAL54Q) de *H. seropedicae* nas concentrações de 1,2, 2,4 ou 4,8  $\mu\text{mol/L}$ . Os ensaios foram realizados na presença de 44  $\mu\text{mol/L}$  ssDNA  $\phi\text{X174}$  circular ou 10  $\mu\text{mol/L}$  de dsDNA  $\phi\text{X174}$  linear, onde indicado, e 0,4 mmol/L de ATP e 0,2  $\mu\text{mol/L}$  de SSB. As amostras foram retiradas e analisadas nos tempos indicados. (B) Cromatograma representativo dos produtos de reação de hidrólise de ATP obtido após a cromatografia em camada delgada das amostras e visualização da imagem em PhosphorImager. Em vermelho está destacado o sinal correspondente ao [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP e em azul, ao [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ADP.

Como a quantidade de ATP hidrolisado foi aproximadamente linear até 60 minutos na presença de 1,2  $\mu\text{mol/L}$  de HsRecA (Figura 4.13), essa concentração foi utilizada nos experimentos seguintes.

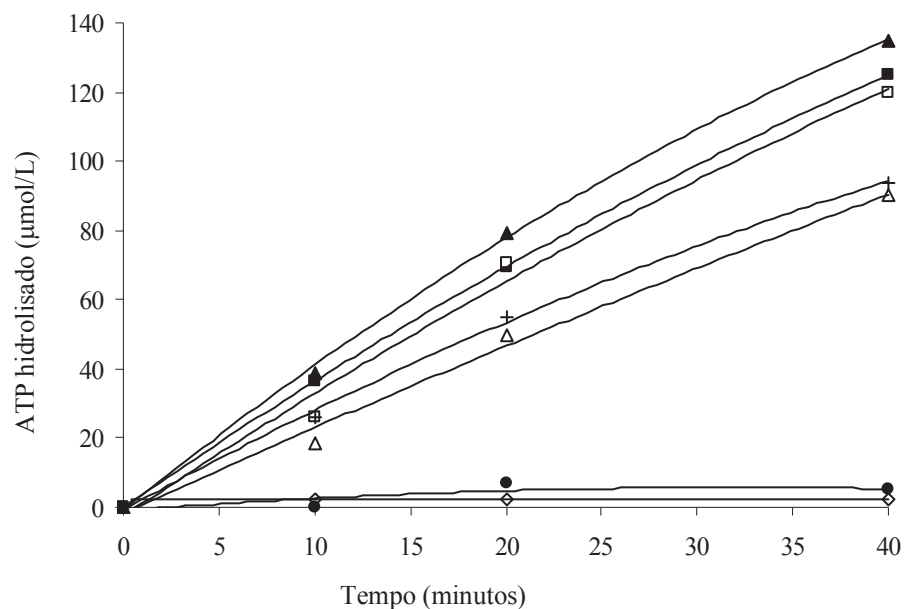
A atividade ATPásica da proteína mutante RecA L54Q também foi determinada nas concentrações de 1,2, 2,4 ou 4,8  $\mu\text{mol/L}$ . Os valores de hidrólise registrados foram próximos a zero indicando que o resíduo de leucina na posição 54 é importante para a atividade ATPásica de RecA (Figura 4.13). Esse resultado indica que o resíduo leucina 54, embora não interfira na ligação de ATP (ver Figura 4.12), impede que haja hidrólise do nucleotídeo. A proteína RecA mutante L51F ou R60C (resíduos do motivo MAW) de *E. coli*, foram igualmente incapazes de hidrolisar ATP (Lauder & Kowalczykowski, 1993). A proteína HsRecA mutante L54Q foi também incapaz de realizar a troca de fitas de DNA (Figura 4.10B) possivelmente porque para completar o processo, a hidrólise de ATP é essencial (revisado por Cox, 2003).

#### 4.3.5.2 Efeito de RecX sobre a Atividade ATPásica da proteína RecA

A proteína RecX não apresentou atividade ATPásica na ausência ou presença de ssDNA (Figura 4.14). Entretanto a atividade ATPásica da proteína RecA (1,2  $\mu\text{mol/L}$ ) na presença de 44  $\mu\text{mol/L}$  de ssDNA foi fortemente inibida por RecX de forma concentração-dependente (Figura 4.14). Na concentração de 10  $\mu\text{mol/L}$ , RecX inibe 90% da atividade ATPásica de RecA, reduzindo o *turnover* de 2,5 para 0,3  $\text{min}^{-1}$  (Figura 4.14). A adição de RecX levou à redução da velocidade de hidrólise de ATP da proteína HsRecA, porém essa se manteve constante durante os tempos de incubação. Em contraste, a adição de EcRecX levou ao decréscimo gradativo da velocidade de hidrólise de ATP da proteína EcRecA (Drees *et al.*, 2004a).



**Figura 4.14 - EFEITO DA PROTEÍNA RecX SOBRE A ATIVIDADE ATPásica DEPENDENTE de ssDNA DA PROTEÍNA RecA DE *H. seropedicae***



O ensaio de atividade de hidrólise de ATP da proteína RecA foi realizado conforme descrito na seção 3.5.6, na presença de 1,2 μmol/L da proteína RecAHis de *H. seropedicae*, 44 μmol/L de ssDNA φX174 circular e concentrações crescentes de RecXHis (em μmol/L): (▲) 0; (■) 0,1; (□) 0,5; (+) 2; (△) 5; (●) 10. A proteína RecX foi adicionada ao sistema de reação juntamente com RecA e o ssDNA. A proteína RecXHis (5 μmol/L) também foi incubada nas mesmas condições na ausência de RecA (◇). A figura mostra um resultado representativo.

A concentração de HsRecX necessária para inibir a atividade ATPásica de HsRecA foi 10 vezes mais alta que a necessária para a inibição da atividade ATPásica da RecA pela RecX de *E. coli* (Drees *et al.*, 2004a) ou de *M. tuberculosis* (Venkatesh *et al.*, 2002). É possível que essa diferença se deva à presença de diferentes concentrações de ssDNA e SSB usadas nos ensaios apresentados neste trabalho. As proteínas RecA de *E. coli* e *M. tuberculosis* foram ensaiadas em uma condição onde o fator limitante foi o DNA e a HsRecA, numa condição de limitação dessa proteína.

A função de SSB é facilitar a formação dos filamentos de RecA e reduzir a re-nucleação de filamentos que estiverem em processo de dissociação (Tsang *et al.*, 1985; Kowalczykowski *et al.*, 1987; Drees *et al.*, 2004a). Nas condições dos ensaios de atividade ATPásica, cada tetrâmero da proteína SSB, ao se ligar ao DNA, ocupa uma região correspondente a 35 nucleotídeos (Lohman & Ferrari, 1994), de forma que ocorre um sítio para SSB (forma tetramérica) a cada 35 nucleotídeos. A proteína EcRecA foi ensaiada na presença de 0,75 mol de SSB por sítio de ligação (Drees *et al.*, 2004a) enquanto HsRecA foi ensaiada em uma condição onde havia 0,04 mol de SSB por sítio. Essa reduzida relação SSB/sítio de ligação no ensaio da HsRecA foi decorrente da alta concentração de ssDNA presente no sistema de reação. Nas condições ensaiadas neste trabalho, a concentração de ssDNA foi 20 vezes maior, de forma que a proteína RecA ocupou 8%, no máximo, das moléculas de ssDNA. A ligação de RecA ao DNA não ocorre de forma homogênea, ou seja, na mesma proporção em todas as moléculas de DNA disponíveis, já que uma vez efetuada a nucleação de RecA no DNA, etapa limitante do processo, o filamento de RecA deve ser totalmente estendido (seção 2.2.1 e revisado por Cox, 2003).

Nestas condições, a adição de HsRecX no sistema reduz a velocidade de hidrólise de ATP em relação à registrada na sua ausência sugerindo que o número de moléculas de HsRecA ligadas ao DNA tenha diminuído. Este valor não sofre redução progressiva ao longo do tempo, como verificado em *E. coli*. Drees *et al.* (2004a), utilizando EcRecA e EcRecX, também notaram a redução da velocidade de hidrólise de ATP após a adição de EcRecX, porém esse efeito ocorreu de forma gradativa. Os autores sugerem que EcRecX bloqueia a associação de EcRecA, sem afetar a dissociação. Segundo esse modelo, como o terminal de extensão está bloqueado pela ligação de RecX e como SSB se liga ao longo do ssDNA formado em consequência da

dissociação de RecA do filamento, RecA torna-se incapaz de efetuar a extensão ou a renucleação, respectivamente.

Os resultados obtidos com a proteína RecA *H seropedicae* foram aplicados no modelo sugerido por Drees *et al.* (2004a) com as devidas adaptações, já que a composição do sistema de reação não foi a mesma. Isto foi feito para determinar se o mecanismo de regulação sugerido por aqueles autores para a EcRecA poderia ser empregado para a HsRecA.

Neste modelo, na presença de ssDNA em excesso e HsRecX, a extensão do filamento de RecA seria inibida pela interação RecA-RecX no terminal de extensão e os monômeros de RecA dissociados poderão iniciar a nucleação em outras moléculas de DNA disponíveis ou renuclear em outra região da molécula de DNA do qual se dissociaram, já que a concentração de SSB não é suficientemente alta para impedir novos eventos de nucleação em todas as moléculas de DNA disponíveis. Quanto maior a concentração de RecX presente, maior será a probabilidade de ocorrer o bloqueio do processo de extensão e a conseqüente redução do número de moléculas de RecA ligadas ao DNA. Nos ensaios utilizando a EcRecA e a proteína RecA de *M. tuberculosis*, devido à baixa concentração de DNA, o bloqueio da extensão do filamento de RecA por RecX induziu a dissociação líquida, uma vez que os eventos de nucleação foram inibidos pela ligação de SSB ao ssDNA. Assim, concentrações menores de RecX foram capazes de induzir a inibição quase total da atividade ATPásica (Venkatesh, 2002; Drees *et al.*, 2004a).

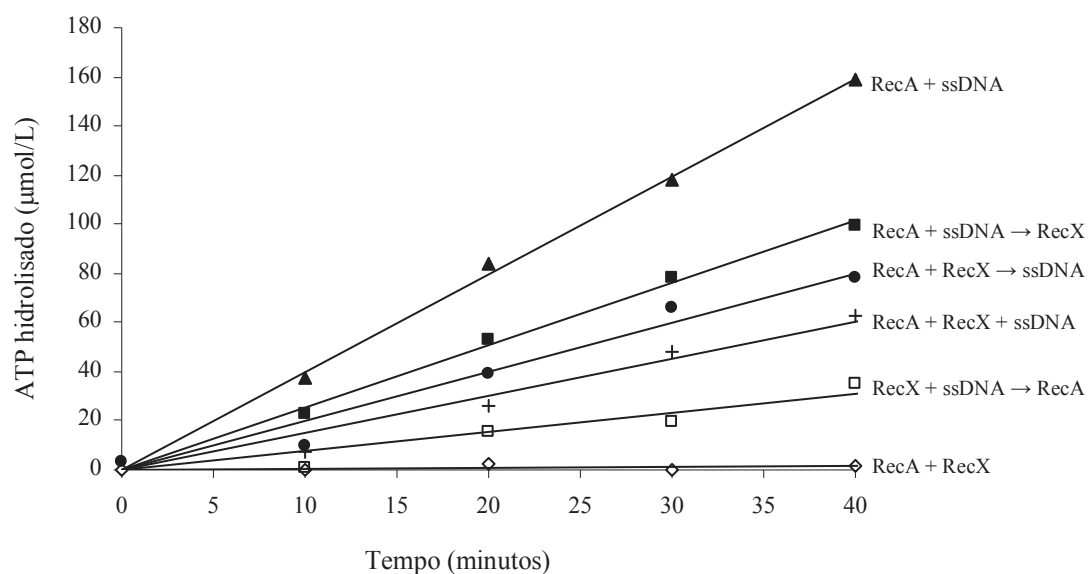
A concentração de HsRecX que induziu aproximadamente metade da inibição da atividade ATPásica de HsRecA (5  $\mu\text{mol/L}$ ; Figura 4.14) foi a utilizada nos demais experimentos. Inicialmente, foi verificado se a ordem de adição dos componentes do sistema modificava a atividade ATPásica de HsRecA. Neste ensaio, dois componentes (RecA e ssDNA, RecA e RecX, ou RecX e DNA) foram pré-incubados por 10 minutos antes da adição do terceiro componente juntamente com SSB e  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Alternativamente, os três componentes (RecA, RecX e ssDNA) foram pré-incubados conjuntamente por 10 minutos, antes da adição de SSB e  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Quando RecX foi adicionada ao sistema após a pré-incubação de RecA com o ssDNA ( $\text{RecA} + \text{ssDNA} \rightarrow \text{RecX}$ ), a taxa de hidrólise de ATP reduziu em 35%, mas quando RecX foi incubada com RecA antes da adição do ssDNA ( $\text{RecA} + \text{RecX} \rightarrow \text{ssDNA}$ ), a

redução foi de 50%. A redução foi ainda maior (60%) quando RecX foi incubada juntamente com o RecA e o DNA (RecA+RecX+ssDNA) (Figura 4.15). Quando RecX foi adicionada ao sistema antes da formação do filamento de RecA (RecX+DNA→RecA) o efeito inibitório foi mais evidente, uma vez que a redução da atividade ATPásica foi de 88% (Figura 4.15). Esses resultados sugerem que a proteína RecX inibe de forma mais efetiva a atividade ATPásica de RecA quando presente antes da formação do filamento de RecA. Aparentemente essa inibição não ocorreu somente devido à interação RecA-RecX, uma vez que a pré-incubação da proteína HsRecX com HsRecA na ausência de ssDNA ou a incubação de RecA+ RecX+ssDNA conjuntamente não reduziu a atividade ATPásica de RecA tão efetivamente. Isso indica que a ligação RecX-DNA pode ser importante para a inibição da formação do filamento de RecA. Estes resultados são coerentes com os apresentados pelas proteínas RecA e RecX de *E. coli* (Drees *et al.*, 2004a). Drees *et al.* (2004a) sugerem que a inibição de RecX sobre RecA foi mais efetiva quando EcRecX foi pré-incubada com o ssDNA porque nessa condição a proteína EcRecX já está disponível para suprimir a extensão do filamento de RecA após cada evento de nucleação.

O modelo proposto por Drees *et al.* (2004a) pode ser utilizado para explicar os resultados obtidos com as proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae*, exceto quando RecX foi pré-incubada com o ssDNA antes da adição da RecA. Esse modelo prevê uma inibição semelhante à verificada nas condições RecA+RecX→ssDNA e RecA+RecX+ssDNA, já que RecX estava previamente disponível nos três sistemas.

Há indícios de que a interação prévia entre ssDNA e RecX é necessária para a completa inibição de RecA. A capacidade de ligação ao DNA apresentada pela proteína RecX de *H. seropedicae* (detalhes na seção 4.3.1.2), suporta essa sugestão. É possível sugerir ainda que a interação de RecX com ssDNA induz mudanças na proteína tornando-a competente para inibir RecA.

**FIGURA 4.15 - EFEITO DA ORDEM DE ADIÇÃO DA PROTEÍNA RecX NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ATPÁSICA DEPENDENTE DE ssDNA DA PROTEÍNA RecA**

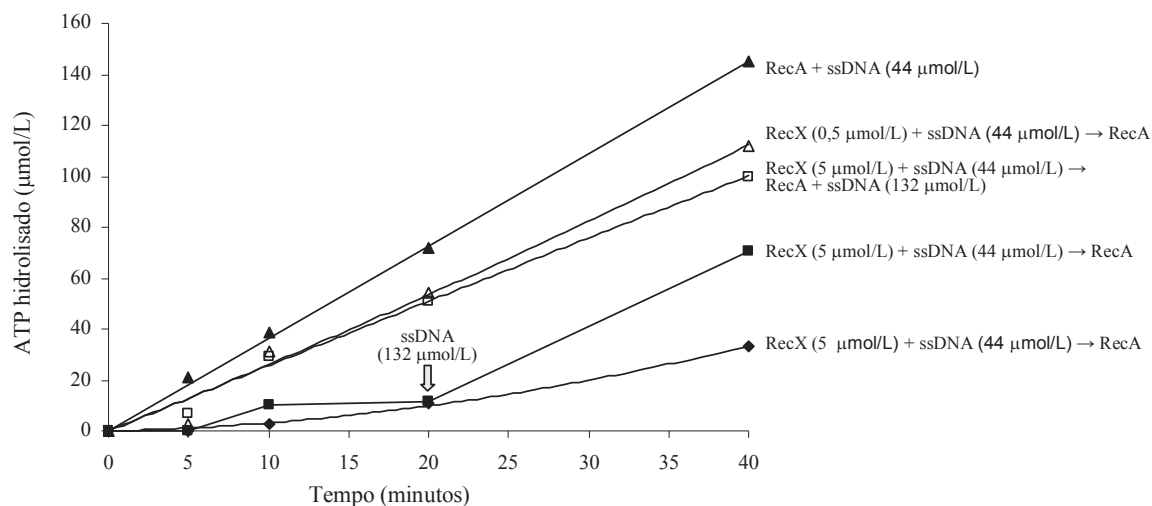


A influência da ordem de adição de componentes na atividade de ATPase da proteína RecA foi determinada conforme descrito na seção 3.5.6. (▲) reação contendo RecA e ssDNA; (■) RecX foi adicionada após a pré-incubação de RecA com ssDNA; (●) RecA e RecX foram pré-incubadas antes da adição de ssDNA; (+) RecA e ssDNA foram incubados na presença de RecX; (□) RecX foi pré-incubada com ssDNA antes da adição de RecA; (◇) RecA e RecX foram incubadas na ausência de ssDNA. As concentrações de RecA<sub>His</sub> e RecX<sub>His</sub> de *H.seropedicae* utilizadas no ensaio foram 1,2 e 5 μmol/L, respectivamente e a concentração de ssDNA foi 44 μmol/L.

Com o objetivo de determinar o envolvimento do DNA na inibição de RecX sobre RecA foram feitos ensaios variando-se a concentração de RecX e ssDNA adicionados e também o momento da adição dos mesmos (Figura 4.16). Quando RecX foi adicionada numa concentração 10 vezes menor (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) do que a usada no experimento mostrado na Figura 4.15, a taxa de hidrólise de ATP reduziu apenas em 20%. Um valor semelhante foi obtido quando 5  $\mu\text{mol/L}$  da proteína RecX foi pré-incubada com 44  $\mu\text{mol/L}$  ssDNA por 10 minutos e RecA foi adicionada juntamente com 132  $\mu\text{mol/L}$  de ssDNA ( $\text{RecX} + \text{ssDNA} \rightarrow \text{RecA} + \text{ssDNA}$ ) (Figura 4.16). Finalmente, a participação do ssDNA na inibição da atividade de RecA por RecX foi claramente observada ao adicionar ao sistema 132  $\mu\text{mol/L}$  de ssDNA, 20 minutos após o início da reação de hidrólise. Nesse caso, a velocidade de hidrólise de ATP quase triplicou com a adição de ssDNA ao sistema (Figura 4.16).

Em todos os ensaios de ATPase realizados, o ssDNA foi adicionado em excesso (44  $\mu\text{mol/L}$ ), logo se RecX apresentasse como mecanismo de inibição apenas o bloqueio da extensão do filamento de RecA, não seria esperada uma modificação do perfil de inibição com um incremento de 3 vezes na concentração de DNA no sistema. Essa observação sugere que a inibição de RecX sobre RecA envolve também a participação da molécula de DNA. Os resultados obtidos sugerem que a ligação da proteína RecX ao ssDNA torna essa molécula indisponível para a ligação de RecA ou limita essa ligação. Apesar da concentração de ssDNA, em termos de nucleotídeos no sistema, ser superior à concentração de RecX (44  $\mu\text{mol/L}$  de ssDNA e 5  $\mu\text{mol/L}$  de RecX), quando esta é dada em termos de moléculas de DNA, a concentração passa a ser de apenas 8,2 nmol/L. Isto significa que para cada molécula de ssDNA, 625 moléculas de RecX estariam disponíveis, quando sua concentração foi de 5  $\mu\text{mol/L}$ . O uso de ssDNA em uma concentração 3 vezes maior de DNA (132  $\mu\text{mol/L}$ ) ou de uma concentração de RecX 10 vezes menor (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) reduziu estas proporções: para cada molécula de ssDNA, 200 ou 60 moléculas de RecX estavam disponíveis, respectivamente. Baseando-se nestes resultados e em dados reportados na literatura foi proposto um modelo de inibição das atividades de RecA pela proteína RecX (Figura 4.17).

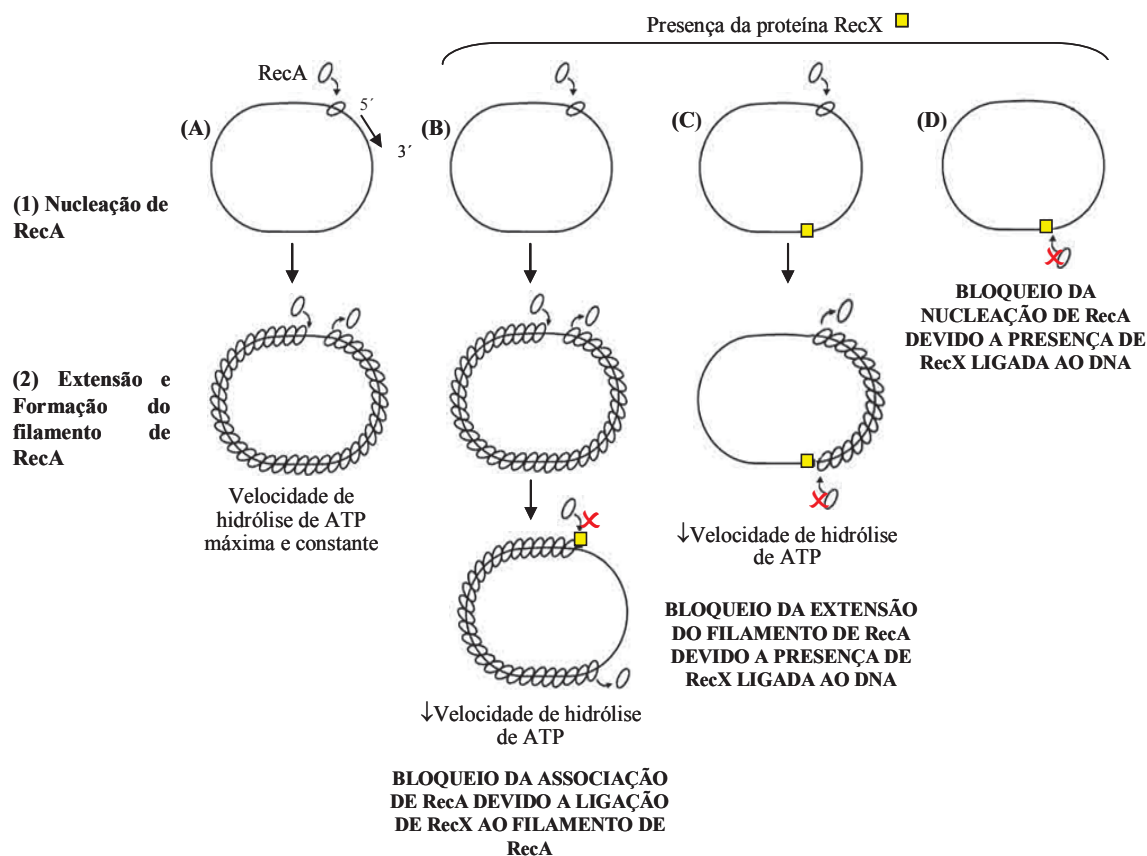
**FIGURA 4.16 - EFEITO DA ADIÇÃO DE ssDNA NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ATPásica DEPENDENTE DE ssDNA DA PROTEÍNA RecA PELA PROTEÍNA RecX.**



Ensaio de atividade de ATPase da proteína RecA foi realizado conforme descrito na seção 3.5.6. A proteína RecX (0,5 μmol/L) foi pré-incubada com ssDNA (44 μmol/L) antes da adição da proteína RecA (Δ); RecX (5 μmol/L) foi pré-incubada com ssDNA (44 μmol/L), antes da adição de RecA e ssDNA (132 μmol/L) (□) RecX (5 μmol/L) foi pré-incubada com ssDNA (44 μmol/L) antes da adição de RecA, e 132 μmol/L de ssDNA após 20 minutos de incubação com RecA (seta cinza; ■). Como controles, a proteína RecA foi ensaiada com 44 μmol/L de ssDNA (◆) e a proteína RecX (5 μmol/L) foi pré-incubada com ssDNA (44 μmol/L) antes da adição de RecA (▲). A proteína RecAHis de *H. seropedicae* foi adicionada às reações na concentração de 1,2 μmol/L.



FIGURA 4.17 - MODELO DE INIBIÇÃO DE RecA PELA PROTEÍNA RecX.



A formação do filamento de RecA no ssDNA ocorre em duas etapas: nucleação lenta seguida de uma extensão rápida 5'→3', levando à formação do filamento de RecA. A dissociação também ocorre nessa direção 5'→3'. (A) Na ausência da proteína RecX, o balanço entre a dissociação e a associação de RecA, mantém o ssDNA circular totalmente preenchido por moléculas de RecA e conseqüentemente conserva constante e máxima a velocidade de hidrólise de ATP. (B) A ligação de RecX ao terminal de associação bloqueia a extensão do filamento de RecA porém não afeta a dissociação, que continua ocorrendo. Além do bloqueio da associação de RecA ao filamento, RecX pode bloquear a extensão do filamento de RecA, porém não afeta a dissociação (C). Nesses dois mecanismos de inibição (B e C), RecA dissocia-se e a velocidade de hidrólise de ATP é reduzida. A ligação de RecX ao ssDNA também pode de alguma forma bloquear a nucleação de RecA ao ssDNA (D).

A inibição de RecA através da ligação da proteína RecX ao DNA provavelmente não é o único mecanismo de controle de RecA por RecX, uma vez que proteínas ortólogas de diferentes microrganismos apresentam diferentes afinidades ao DNA. Neste trabalho a formação do complexo HsRecX-dsDNA ou HsRecX-ssDNA foi visualizada a partir da concentração de 0,25  $\mu\text{mol/L}$  e 1  $\mu\text{mol/L}$  de RecX, respectivamente, enquanto a proteína RecX de *M. tuberculosis* não foi capaz de ligar ssDNA ou dsDNA linear (Venkatesh *et al.*, 2002). A proteína RecX de *E. coli*, por sua vez, foi capaz de ligar-se ao ssDNA e dsDNA 100 mers somente em concentrações acima de 1  $\mu\text{mol/L}$  (Stohl *et al.*, 2003; Drees *et al.*, 2004a).

A proteína RecX de *H. seropedicae* foi necessária em uma concentração mais elevada para inibir a atividade ATPásica de RecA do que a atividade de troca de fitas homólogas de DNA. A atividade de troca de fitas da HsRecA foi inibida completamente quando RecX encontrava-se presente na concentração de 2  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 4.11). RecX, na concentração de 5  $\mu\text{mol/L}$ , quando adicionada após a pré-incubação de RecA com o DNA, foi capaz de reduzir em 35% a atividade ATPásica de HsRecA (Figura 4.15). Essa inibição chegou a cerca de 90% quando RecX, na mesma concentração, foi pré-incubada com o DNA antes da adição de RecA (Figura 4.15). A maior concentração de RecX para a inibição da atividade ATPásica de HsRecA aparentemente foi decorrente do excesso de DNA presente nesse experimento. Entretanto é possível que a presença do dsDNA apenas no ensaio de troca de fitas, substrato pelo qual RecX apresenta maior afinidade (Figura 4.3 e 4.4), tenha tornado a inibição de RecX mais efetiva. A concentração de RecX necessária para inibir as atividades de RecA de *M. tuberculosis* (MtRecA) também foi variável. Foi necessária uma menor concentração de MtRecX para inibir a atividade de troca de fitas de DNA da MtRecA, em relação à necessária para inibir a sua atividade de hidrólise de ATP, ambos experimentos desenvolvidos em condições limitantes de DNA (Venkatesh *et al.*, 2002). A proteína EcRecA apresentou um perfil de inibição por EcRecX oposto: em concentrações subestequiométricas, RecX inibiu a atividade ATPásica de EcRecA enquanto apenas em concentrações estequiométricas inibiu a atividade de troca de fitas de DNA (Stohl *et al.*, 2003; Drees *et al.*, 2004a).

A proteína RecX de *H. seropedicae* mostrou ser um potente inibidor da atividade de RecA *in vitro*. Diante dessa evidência surge a pergunta: Por que a célula

possui um mecanismo de inibição de processos essenciais como a recombinação homóloga e reparo SOS? A ocorrência desses processos diante de substratos inapropriados como regiões de ssDNA presentes na forquilha de replicação, DNAs contendo seqüências repetitivas e/ou moléculas de DNA exógenas, introduzidas por transdução, por exemplo, poderiam induzir a introdução de mutações, deleções e/ou seqüências de DNA exógenas, gerando mudanças indesejáveis no genoma.

O requerimento do sistema de reparo de pareamento incorreto para a manutenção da fidelidade do processo de recombinação homóloga indica claramente que além das propriedades intrínsecas das proteínas envolvidas na replicação, outros sistemas de regulação são necessários (Modrich & Lahue, 1996). Story *et al.* (1992) sugeriram que a formação de agregados de filamentos de RecA, denominados feixes, seja uma forma de supressão da formação de filamentos de RecA ativos, sugerindo que a inibição de RecA seja um mecanismo necessário e essencial em algumas situações particulares. Essas estruturas são formadas na presença (Egelman & Stasiak, 1988) ou na ausência de DNA e sua formação é inibida pela presença de ADP ou ATP (Brenner *et al.*, 1988).

As proteínas RecX e DinI de *E. coli* controlam a atividade de RecA de forma antagônica (Lusetti *et al.*, 2004b), e fazem parte do grupo de proteínas moduladoras de RecA, que conta também com as proteínas RecFOR, RecBCD, SSB, LexA e UmuD. Esta rede regulatória de RecA é bastante complexa em *E. coli*. Entre as proteínas regulatórias de RecA, pelo menos duas agem diretamente na disponibilização do DNA para a proteína RecA. A proteína SSB, que ao interagir com o ssDNA alvo de RecA, tanto pode agir como moduladora negativa quanto positiva da proteína RecA e o complexo RecBCD, que catalisa a formação de terminais 3' que servem de alvo para a ligação de RecA e a formação do filamento de RecA. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que além de SSB e RecBCD, a proteína RecX também modula a atividade de RecA controlando a disponibilidade da molécula alvo dessa proteína.

## 5 CONCLUSÕES

- As proteínas RecA nativa, RecAHis, RecA mutante L54Q, RecA mutante L54Q G73A, RecX nativa e RecXHis de *Herbaspirillum seropedicae* foram purificadas e caracterizadas bioquimicamente;
- As proteínas RecA e RecX de *H. seropedicae* (HsRecA e HsRecX) formaram um complexo de migração eletroforética modificada em relação às proteínas isoladas;
- As proteínas HsRecA e HsRecX possuem atividade de ligação ao DNA de fita simples ou dupla na ausência de ATP;
- A proteína HsRecA apresenta uma afinidade aparente maior pelo DNA de fita simples, enquanto HsRecX, ao DNA de fita dupla;
- A proteína HsRecX liga-se ao DNA fita dupla mesmo na presença de HsRecA;
- O resíduo de leucina na posição 54 da proteína HsRecA está envolvido na hidrólise de ATP e na troca de fitas de DNA, mas não na ligação do ATP;
- A proteína HsRecX inibe as atividades de hidrólise de ATP e troca de fitas de DNA da proteína HsRecA, porém não afeta a ligação do ATP;
- A proteína HsRecX aparentemente modula as atividades de HsRecA através da interação direta RecX-RecA e do controle da disponibilidade do DNA substrato para a nucleação de RecA ou a extensão do filamento de RecA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, 25, 3389-3402.
- AMUNDSEN, S. K.; TAYLOR, A. F., CHAUDHURY; A. M., AND SMITH, G. R. (1986). *recD*: the gene for an essential third subunit of exonuclease V. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83, 5558-55562.
- ANDERSON, D. G.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1997a). The recombination hot spot  $\chi$  is a regulatory element that switches the polarity of DNA degradation by the RecBCD enzyme. **Genes Dev.**, 11, 571-581.
- ANDERSON, D. G.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1997b). The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a  $\chi$ -regulated manner. **Cell**, 90, 77-86.
- ARENSON, T. A.; TSODIKOV, O. V.; COX, M. M. (1999). Quantitative analysis of the kinetics of end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA. **J. Mol. Biol.**, 288, 391-401.
- ARNOLD, D. A.; HANDA, N.; KOBAYASHI, I.; AND KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2000). A novel, 11 nucleotide variant of  $\chi$ ,  $\chi^*$ : one of a class of sequences defining the *Escherichia coli* recombination hotspot  $\chi$ . **J. Mol. Biol.**, 300, 469-479.
- BAGG, A.; KENYON C. J.; WALKER, G. C. (1981). Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78, 5749-5753.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Intl. J. Sys. Bact.**, 36, 86-93.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI J. I.; OLIVARES F.; DÖBEREINER J. (1991). Identification and Ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, 13, 65-73.
- BECHEREL, O. J.; FUCHS, R. P.; WAGNER, J. (2002). Pivotal role of the beta-clamp in translesion DNA synthesis and mutagenesis in *E. coli* cells. **DNA Repair**, 1, 703-708.
- BEDALE W. A.; COX, M. M. (1996). Evidence for the coupling of ATP hydrolysis to the final (extension) phase of RecA protein mediated DNA strand exchange. **J. Biol. Chem.**, 271, 5725-5732.

- BEERNINK, H. T.; MORRICAL, S. W. (1999) RMPs: recombination/replication mediator proteins. **Trends Biochem. Sci.**, 24, 385-389.
- BENEDICT, R. C.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1988). Increase of the DNA strand assimilation activity of RecA protein by removal of the C terminus and structure function studies of the resulting protein fragment. **J. Biol. Chem.**, 263, 15513-15520.
- BIANCO, P. R.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. RecA protein. In: **Enciclopedia of Life Science**. California: Editor Stylesheet, 1998, 1-11.
- BIANCO, P. R.; TRACY, R. B.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1998). DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. **Front. Biosci.**, 3, 570-603.
- BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. (1995). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, 174, 195-209.
- BONNER, C. A.; RANDALL, S. K.; RAYSSIGUIER, C.; RADMAN, M.; ERITJA, R.; KAPLAN, B. E.; MCENTEE, K.; GOODMAN, M. F. (1988). Purification and characterization of an inducible *Escherichia coli* DNA polymerase capable of insertion and bypass at abasic lesions in DNA. **J. Biol. Chem.**, 263, 18946-18952.
- BORK, J. M.; COX, M. M.; INMAN, R. B. (2001). RecA protein filaments disassemble in the 5' to 3' direction on single-stranded DNA. **J. Biol. Chem.**, 276:45740-45743.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248-254, 1976.
- BRENDEL, V.; BROCCHERI, L.; SANDLER, S. J.; CLARK, A. J.; KARLIN, S. (1997). Evolutionary comparisons of RecA-like proteins across all major kingdoms of living organisms. **J. Mol. Evol.**, 44, 528-541.
- BRENNER, S. L.; MITCHELL, R. S.; MORRICAL, S. W.; NEUENDORF, S. K.; SCHUTTE, B. C.; COX, M. M. (1987). RecA protein-promoted ATP hydrolysis occurs throughout RecA nucleoprotein filaments. **J. Biol. Chem.**, 262, 4011-4016.
- BRENNER, S. L.; ZLOTNICK, A.; GRIFFITH, J. D. (1988). RecA protein self-assembly multiple discrete aggregation states. **J. Mol. Biol.**, 204, 959-972.
- BRENT, R.; PTASHNE, M. (1980). The *lexA* gene product represses its own promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77, 1932-1936.
- BRENT, R.; PTASHNE, M. (1981). Mechanism of action of the *lexA* gene product. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78, 4204-4208.



- BUJALOWSKI, W.; OVERMAN, L. B.; LOHMAN, T. M. (1988). Binding mode transitions of *Escherichia coli* single strand binding protein-single-stranded DNA complexes. Cation, anion, pH, and binding density effects. **J. Biol. Chem.**, 263, 4629-4640.
- BULLOCK, W. O.; FERNANDEZ, J. M. (1987). XL1-Blue - a high-efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. **Biotechniques**, 5, 376-379.
- BURCKHARDT, S. E.; WOODGATE, R.; SCHEUERMANN, R. H.; ECHOLS, H. (1988). UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification, and cleavage by RecA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85, 1811-1815.
- CHURCHILL, J. J.; ANDERSON, D. G.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1999). The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of chi, resulting in constitutive recombination activation. **Genes Dev.**, 13, 901-911.
- CHURCHILL, J. J.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2000). Identification of the RecA protein-loading domain of RecBCD enzyme. **J. Mol. Biol.**, 297, 537-542.
- CLARK, A. J. (1967). The beginning of a genetic analysis of recombination proficiency. **J. Cell. Comp. Physiol.**, 70, 165-180.
- CLARK, A. J.; CHAMBERLIN, M.; BOYCE, R. P.; HOWARD-FLANDERS, P. (1966). Abnormal metabolic response to ultraviolet light of a recombination deficient mutant of *Escherichia coli* K12. **J. Mol. Biol.**, 19, 442-454.
- CLARK, A. J.; MARGULIES, A. D. (1965). Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 53, 451-459.
- CORDEIRO-STONE, M.; MAKHOV, A. M.; ZARITSKAYA, L. S.; GRIFFITH, J. D. (1999). Analysis of DNA replication forks encountering a pyrimidine dimer in the template to the leading strand. **J. Mol. Biol.**, 289, 1207-1218.
- COURCELLE, J.; CARSWELL-CRUMPTON, C.; HANAWALT, P. C. (1997). *recF* and *recR* are required for the resumption of replication at DNA replication forks in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94, 3714-3719.
- COURCELLE, J.; CROWLEY, D. J.; HANAWALT, P. C. (1999). Recovery of DNA replication in UV-irradiated *Escherichia coli* requires both excision repair and RecF protein function. **J. Bacteriol.**, 181, 916-922.
- COURCELLE, J.; HANAWALT, P. C. (2003). RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. **Annu. Rev. Genet.**, 37, 611-646.



- COURCELLE, J.; KHODURSKY, A.; PETER, B.; BROWN, P. O.; HANAWALT, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. **Genetics**, 158, 41-64.
- COX, M. M.; LEHMAN, I. R. (1981a). Directionality and polarity in RecA protein-promoted branch migration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78, 6018-6022.
- COX, M. M.; LEHMAN, I. R. (1981b). RecA protein of *Escherichia coli* promotes branch migration, a kinetically distinct phase of DNA strand exchange. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78, 3433-3437.
- COX, M. M.; LEHMAN, I. R. (1982). RecA protein promoted DNA strand exchange. Stable complexes of RecA protein and single-stranded DNA formed in the presence of ATP and single-stranded DNA binding protein. **J. Biol. Chem.**, 257, 8523-8532.
- COX, M. M.; LEHMAN, I. R. (1987). Enzymes of general recombination. **Annu. Rev. Biochem.**, 56: 229-262.
- COX, M. M. (1994). Why does RecA protein hydrolyze ATP? **Trends Biochem. Sci.**, 19, 217-222.
- COX, M. M.; GOODMAN, M. F.; KREUZER, K. N.; SHERRATT, D. J.; SANDLER, S. J.; MARLANS, K. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. **Nature**, 404, 37-41.
- COX, M. M. (2001). Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. **Annu. Rev. Genet.**, 35, 53-82.
- COX, M. M. (2003). The bacterial RecA protein as a motor protein. **Annu. Rev. Microbiol.**, 57, 551-577.
- COX, J. M.; TSODIKOV, O. V.; COX, M. M. (2005). Organized unidirectional waves of ATP hydrolysis within a RecA filament. **PLoS Biology**, 3, 231-243.
- CROWLEY, D. J.; COURCELLE, J. (2002). Answering the call: coping with DNA damage at the most inopportune time. **J. Biomed. Biotechnol.**, 2, 66-74.
- CUNNINGHAM, R. P.; WU, A. M.; SHIBATA, T.; DASGUPTA, C.; RADDING, C. M. (1981). Homologous pairing and topological linkage of DNA molecules by combined action of *E. coli* RecA protein and topoisomerase I. **Cell**, 24, 213-223.
- DATTA, S.; PRABU, M. M.; VAZE, M. B.; GANESH, N.; CHANDRA, N. R.; MUNIYAPPA, K.; VIJAYAN, M. (2000). Crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* RecA and its complex with ADP-AlF<sub>4</sub>: implications for decreased ATPase activity and molecular aggregation. **Nucl. Acids Res.**, 28, 4964-4973.

- DATTA, S.; GANESH, N.; CHANDRA, N. R.; MUNIYAPPA, K.; VIJAYAN, M. (2003a). Structural studies on MtRecA nucleotide complexes: Insights into DNA and nucleotide binding and the structural signature of NTP recognition. **Proteins Struct. Funct. Genet.**, 50, 474-485.
- DATTA, S.; KRISHNA, R.; GANESH, N.; CHANDRA, N. R.; MUNIYAPPA, K. VIJAYAN, M. (2003b). Crystal structures of *Mycobacterium smegmatis* RecA and its nucleotide complexes. **J. Bacteriol.**, 185, 4280-4284.
- DE VRIES, J.; WACKERNAGEL, W. (1992). Recombination and UV resistance of *Escherichia coli* with the cloned *recA* and *recBCD* genes of *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis*: evidence for an advantage of interspecies combination of *P. mirabilis* RecA protein and RecBCD enzyme. **J. Gen. Microbiol.**, 138, 31-38.
- DI CAPUA, E.; ENGEL, A.; STASIAK, A.; KOLLER, T. (1982). Characterization of complexes between RecA protein and duplex DNA by electron microscopy. **J. Mol. Biol.**, 157, 87-103.
- DILLINGHAM, M. S.; SPIES, M.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2003). RecBCD enzyme is a bipolar DNA helicase. **Nature**, 423, 893-897.
- DIXON, D. A.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1991). Homologous pairing the in vitro stimulated by the recombination hotspot, *chi*. **Cell**, 66, 361-371.
- DIXON, D. A.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1993). The recombination hotspot  $\chi$  is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *E. coli* RecBCD enzyme. **Cell**, 73, 87-96.
- DONALDSON, J. R.; COURCELLE, C. T.; COURCELLE, J. (2004). RuvAB and RecG are not essential for the recovery of DNA synthesis following UV-induced DNA damage in *Escherichia coli*. **Genetics**, 166, 1631-1640.
- DREES, J. C.; LUSETTI, S.L.; CHITTENI-PATTU, S.; INMAN, R. B.; COX, M. M. (2004a). A RecA filament capping mechanism for RecX protein. **Mol. Cell.**, 15, 789-798.
- DREES, J. C.; LUSETTI, S. L.; COX, M. M. (2004b). Inhibition of RecA protein by the *Escherichia coli* RecX protein: Modulation by the RecA C-terminus and filament functional state. **J. Biol. Chem.**, 279, 52991- 52997.
- ECHOLS, H. (1982). Mutation rate: some biological and biochemical considerations. **Biochimie**, 64, 571-575.
- ECHOLS, H.; GOODMAN, M. F. (1990). Mutation induced by DNA damage: a many protein affair. **Mutation Res.**, 26, 301 - 311.

- EGELMAN, E. H. (1993). What do X-ray crystallographic and electron microscopic structural studies of the RecA protein tell us about recombination? **Curr. Opin. Struct. Bio.**, 3, 189-197.
- EGELMAN, E. H.; STASIAK, A. (1986). Structure of helical RecA-DNA complexes. Complexes formed in the presence of ATP-gamma-S or ATP. **J. Mol. Biol.**, 191, 677-697.
- EGELMAN, E. H.; STASIAK, A. (1988). Structure of helical RecA-DNA complexes. II. Local conformational changes visualized in bundles of RecA-ATP gamma S filaments. **J. Mol. Biol.**, 200, 329-349.
- EGELMAN, E. H.; STASIAK, A. (1993). Electron microscopy of RecA-DNA complexes: Two different states, their functional significance and relation to the solved crystal structure. **Micron**, 24, 309-324.
- EGGLER, A. L.; LUSETTI, S. L.; COX, M. M. (2003). The C-terminus of the *E. coli* RecA protein modulates the DNA binding competition with single-stranded DNA-binding protein. **J. Biol. Chem.**, 278, 16389-16396.
- EMMERSON, P. T. (1968). Recombination deficient mutants of *Escherichia coli* K-12 that map between *thyA* and *argA*. **Genetics**. 60, 19-30.
- ENNIS, D. G.; OSSANNA, N.; MOUNT, D. W. (1989). Genetic separation of *Escherichia coli* recA functions for SOS mutagenesis and repressor cleavage. **J. Bacteriol.**, 171, 2533-2541.
- FERNANDEZ DE HENESTROSA, A. R.; OGI, T.; AOYAGI, S.; CHAFIN, D.; HAYES, J. J. (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, 35, 1560-1572.
- FORMOSA, T.; ALBERTS, B. M. (1986). Purification and characterization of the T4 bacteriophage UvsX protein. **J. Biol. Chem.**, 261, 6107-6118.
- FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. ASM Press, Washington, 1995
- FUJII, S.; GASSER, V.; FUCHS, R. P. (2004). The biochemical requirements of DNA polymerase V-mediated translesion synthesis revisited. **J. Mol. Biol.**, 341, 405-417.
- GALVÃO, C. W. Sequenciamento, mutagênese e caracterização dos genes *recA* e *recX* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, 91p., 2001.
- GALVÃO, C. W.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. R. (2003) The *recX* gene product is involved in the SOS response in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, 49, 145-150.

- GLICKMAN, B. W. (1979). *rorA* mutation of *Escherichia coli* K-12 affects the RecB subunit of exonuclease V. **J. Bacteriol.**, 137, 658-660.
- GOODMAN, M. F. (2000). Coping with replication 'train wrecks' in *Escherichia coli* using Pol V, Pol II, and RecA proteins. **Trends Biochem. Sci.**, 25, 189-195.
- GOODMAN, M.F. (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. **Annu. Rev. Biochem.** 70, 17-50.
- GRANT, S. G. N.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R.; HANAHAN, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 87, 4645-4649.
- GRIFFITH, J.; FORMOSA, T. (1985). The UvsX protein of bacteriophage T4 arranges single-stranded and doublestranded DNA into similar helical nucleoprotein filaments. **J. Biol. Chem.**, 260, 4484-4491.
- GUILIANI, N.; BENGRINE, A.; BORNE, F.; CHIPPAUX, M.; BONNEFOY V. (1997). Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* gene from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. **Microbiology**, 143, 2179-2187.
- GUPTA, R. C.; GOLUB, E.; BI, B.; RADDING, C. M. (2001). The synaptic activity of HsDmc1, a human recombination protein specific to meiosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98, 8433-8439.
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, 41, 95-98.
- HANDA, N.; BIANCO, P. R.; BASKIN, R. J.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2005). Direct visualization of RecBCD movement reveals cotranslocation of the RecD motor after  $\chi$  recognition. **Mol. Cell**, 17, 745-750.
- HARMON, F. G.; REHRAUER, W. M.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. (1996). Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. II. Inhibition of DNA strand exchange by the uncleavable LexA S119A repressor argues that recombination and SOS induction are competitive processes. **J. Biol. Chem.**, 271, 23874-23883.
- HARUTA, N.; YU, X. N.; YANG, S. X.; EGELMAN, E. H.; COX, M. M. (2003). A DNA pairing enhanced conformation of bacterial RecA proteins. **J. Biol. Chem.**, 278, 52710-52723.
- HEUSER, J.; GRIFFITH, J. (1989). Visualization of RecA protein and its complexes with DNA by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. **J. Mol. Biol.**, 210, 473-484.

- HORII, Z.; CLARK, A. J. (1973). Genetic analysis of the *recF* pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: Isolation and characterization of mutants. **J. Mol. Biol.**, 80, 327-328.
- HORN, J. M.; OHMAN, D. E. (1988). Transcriptional and translational analyses of *recA* mutant alleles in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, 170, 1637-1650.
- HOWARD-FLANDERS, P. (1973). DNA repair and recombination. **Br. Med. Bull.**, 29, 226-235.
- HOWARD-FLANDERS, P.; THERIOT, L. (1966). Mutants of *Escherichia coli* K-12 defective in DNA repair and in genetic recombination. **Genetics**, 53, 1137-1150.
- HOWARD-FLANDERS, P.; WEST, S.C.; STASIAK, A. (1984). Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination. **Nature**, 309, 215-219.
- IWASAKI, H.; NAKATA, A.; WALKER, G. C.; SHINAGAWA, H. (1990). The *Escherichia coli polB* gene, which encodes DNA polymerase II, is regulated by the SOS system. **J. Bacteriol.**, 172, 6268-6273.
- JAIN, S. K.; COX, M. M.; INMAN, R. B. (1994). On the role of ATP hydrolysis in RecA protein-mediated DNA strand exchange III. Unidirectional branch migration and extensive hybrid DNA formation. **J. Biol. Chem.**, 269, 20653-20661.
- KARLIN, S.; BROCCHERI, L. (1996). Evolutionary conservation of *recA* genes in relation to protein structure and function. **J. Bacteriol.**, 178, 1881-1894.
- KENYON, C. J.; WALKER, G. C. (1980). DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77, 2819-2823.
- KIM, J. I.; COX, M. M.; INMAN, R. B. (1992). On the role of ATP hydrolysis in RecA protein-mediated DNA strand exchange. I. Bypassing a short heterologous insert in one DNA substrate. **J. Biol. Chem.**, 267, 16438-16443.
- KODADEK, T.; WONG, M. L.; ALBERTS, B. M. (1988). The mechanism of homologous DNA strand exchange catalyzed by the bacteriophage T4 uvsX and gene 32 proteins. **J. Biol. Chem.**, 263, 9427-9436.
- KOMORI, K.; SAKAE, S.; SHINAGAWA, H.; MORIKAWA, K.; ISHINO, Y. (1999). A Holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: functional similarity to *Escherichia coli* RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in *Bacteria*, *Eukarya*, and *Archaea*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96, 8873-8878.



- KOMORI, K.; MIYATA, T.; DIRUGGIERO, J.; HOLLEY-SHANKS, R.; HAYASHI, I.; CANN, I. K.; MAYANAGI, K.; SHINAGAWA, H.; ISHINO, Y. (2000). Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. **J. Biol. Chem.**, 275, 33782-33790.
- KONOLA, J. T.; LOGAN, K. M.; KNIGHT, K. L. (1994). Functional characterization of residues in the P-loop motif of the RecA protein ATP binding site. **J. Mol. Biol.**, 237, 20-34.
- KORNBERG, A.; BAKER, T. A. **DNA replication**. W. H. Freeman & Co., New York, 1992.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1987). Mechanistic aspects of the DNA strand exchange activity of *Escherichia coli* RecA protein. **Trends Biochem. Sci.**, 12, 141-145.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1991). Biochemistry of genetic recombination: energetics and mechanism of DNA strand exchange. **Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.**, 20, 539-575.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C.; CLOW, J.; KRUPP R. A. (1987). Properties of the duplex DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* RecA protein and its role in branch migration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84, 3127-3131.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C.; EGGLESTON, A. K. (1994). Homologous pairing and DNA strand exchange proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, 63, 991-1043.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C.; KRUPP R. A. (1987). Effects of *Escherichia coli* SSB protein on the single-stranded DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* RecA protein. Evidence that SSB protein facilitates the binding of RecA protein to regions of secondary structure within single-stranded DNA. **J. Mol. Biol.**, 193, 97-113.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C.; KRUPP, R. A. (1995). DNA-strand exchange promoted by RecA protein in the absence of ATP: Implications for the mechanism of energy transduction in protein-promoted nucleic acid transactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92, 3478-3482.
- KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A. M.; ALLONI, G.; AZEVEDO, V. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, 390, 249-256.
- KURUMIZAKA, H.; AIHARA, H.; IKAWA, S.; SHIBATA, T. (2000). Specific defects in double-stranded DNA unwinding and homologous pairing of a mutant RecA protein. **FEBS Lett.**, 477, 129-134.

- KUZMINOV, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 63, 751-813.
- LAEMMLI, D. K. (1970). Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-683.
- LAUDER, S. D.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1993). Negative co-dominant inhibition of RecA protein function. Biochemical properties of the RecA1, RecA13 and RecA56 proteins and the effect of RecA56 protein on the activities of the wild-type RecA protein function *in vitro*. **J. Mol. Biol.**, 234, 72-86.
- LAVERY, P. E.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1992). A postsynaptic role for single-stranded DNA-binding protein in RecA protein-promoted DNA strand exchange. **J. Biol. Chem.**, 267, 9315-9320.
- LEDERBERG, J. (1947). Gene recombination and linked segregations in *Escherichia coli*. **Genetics**, 32, 505-525.
- LEE, J. W.; COX, M. M. (1990). Inhibition of RecA protein-promoted ATP hydrolysis. I. ATP $\gamma$ S and ADP are antagonistic inhibitors. **Biochemistry**, 29, 7666-7676.
- LENNE-SAMUEL, N.; WAGNER, J.; ETIENNE, H.; FUCHS, R. P. (2002). The processivity factor beta controls DNA polymerase IV traffic during spontaneous mutagenesis and translesion synthesis *in vivo*. **EMBO Rep.**, 3, 45-49.
- LEWIS, L. K.; HARLOW, G. R.; GREGG-JOLLY, L. A.; MOUNT, D. W. (1994). Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, 241, 507-523.
- LINDSLEY, J. E.; COX, M. M. (1989). Dissociation pathway for RecA nucleoprotein filaments formed on linear duplex DNA. **J. Mol. Biol.**, 205, 695-711.
- LINDSLEY, J. E.; COX, M. M. (1990). Assembly and disassembly of RecA protein filaments occurs at opposite filament ends: relationship to DNA strand exchange. **J. Biol. Chem.**, 265, 9043-9054.
- LITTLE, J. W. (1993). LexA cleavage and other self-processing reactions. **J. Bacteriol.**, 175, 4943-4950.
- LITTLE, J. W.; MOUNT, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. **Cell**, 29, 11-22.
- LITTLE, J. W.; MOUNT, D. W.; YANISCH-PERRON, C. R. (1981). Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78, 4199-4203.



- LLOYD R. G.; SHARPLES, G. J. (1993). Processing of recombination intermediates by the RecG and RuvAB proteins of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, 21, 1719-1725.
- LLOYD, R. G.; LOW, B. (1976). Some genetic consequences of changes in the level of *recA* gene function in *Escherichia coli* K-12. **Genetics**, 84, 675-695.
- LOGAN, K. M.; KNIGHT, K. L. (1993). Mutagenesis of the P-loop motif in the ATP binding site of the RecA protein from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, 232, 1048-1059.
- LOHMAN, T. M.; BUJALOWSKI, W.; OVERMAN, L. B. (1988). *E. coli* single strand binding protein: a new look at helix-destabilizing proteins. **Trends Biochem. Sci.**, 13, 250-255.
- LOHMAN, T. M.; FERRARI, M. E. (1994). *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. **Annu. Rev. Biochem.**, 63, 527-570.
- LOVETT, S. T. (2003). Connecting replication and recombination. **Mol. Cell**, 11, 554-556.
- LUDDEN P. W., ROBERTS G. P. (1989). Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation.. **Curr. Top. Cell. Regul.**, 30, 23-56.
- LUO, Y.; PFUETZNER, R. A.; MOSIMANN, S.; PAETZEL, M.; FREY, E. A.; CHERNEY, M.; KIM, B.; LITTLE, J. W.; STRYNADKA, N. C. (2001). Crystal structure of LexA: A conformational switch for regulation of self-cleavage. **Cell**, 106, 585-594.
- LUSETTI S. L.; COX M. M. (2002). The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. **Annu. Rev. Biochem.**, 71, 71-100.
- LUSETTI, S.; SHAW, J.; COX, M. M. (2003). Magnesium ion-dependent activation of the RecA protein involves the C Terminus. **J. Biol. Chem.**, 278, 16381-16388.
- LUSETTI, S. L.; VOLOSHIN, O. N.; INMAN, R. P.; CAMERINI-OTERO, C. S.; COX, M. M. (2004a). The DinI protein stabilizes RecA protein filaments. **J. Biol. Chem.**, 279, 30037-30046.
- LUSETTI, S. L.; DREES, J. C.; COX, M. M. (2004b). The DinI and RecX proteins are competing modulators of RecA function. **J. Biol. Chem.**, 279, 55073 - 55079.
- MADIRAJU, M. V.; LAVERY P. E.; KOWALCZYKOWSKI, S. C.; CLARK, A. J. (1992). Enzymatic properties of the RecA803 protein, a partial suppressor of *recF* mutations. **Biochemistry**, 31, 10529-10535.

- MASUI, R.; MIKAWA, T.; KATO, R.; KURAMITSU, S. (1998). Characterization of the oligomeric states of RecA protein-monomeric RecA protein can form a nucleoprotein filament. **Biochemistry**, 37, 14788–14797.
- MCENTEE, K.; WEINSTOCK, G. M.; LEHMAN, I. R. (1981). Binding of the RecA protein of *Escherichia coli* to single- and double- stranded DNA. **J. Biol. Chem.**, 256, 8835-8844.
- MCGLYNN, P.; LLOYD, R. G. (2000). Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. **Cell**, 101, 35-45.
- MCGLYNN, P.; LLOYD, R. G. (2001). Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98, 8227-34.
- MCGLYNN, P.; LLOYD, R. G. (2002). Recombinational repair and restart of damaged replication forks. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 3, 859-870.
- MCGREW, D. A.; KNIGHT, K. L. (2003). Molecular design and functional organization of the RecA protein. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 38, 385–432.
- MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. (1986). Single-stranded DNA “blue” T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Protein Eng.**, 1, 67-74.
- MEISENHEIMER, K. M.; KOCH, T. H. (1997) Photocross-linking of nucleic acids to associated proteins. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 32, 101-140.
- MENETSKI, J. P.; BEAR, D. G.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1990). Stable DNA heteroduplex formation catalyzed by the *Escherichia coli* RecA protein in the absence of ATP hydrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87, 21-25.
- MENETSKI, J. P.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1985). Interaction of recA protein with single-stranded DNA: Quantitative aspects of binding affinity modulation by nucleotide cofactors. **J. Mol. Biol.**, 181, 281-295.
- MENETSKI, J. P.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1989). Enhancement of *Escherichia coli* RecA protein enzymatic function by dATP. **Biochemistry**, 28, 5871-5881.
- MENGE, K. L.; BRYANT, F. R. (1988). ATP-stimulated hydrolysis of GTP by RecA protein: kinetic consequences of cooperative RecA protein-ATP interactions. **Biochemistry**, 27, 2635-2640.

- MENGE, K. L.; BRYANT, F. R. (1992). Effect of nucleotide cofactor structure on RecA protein-promoted DNA pairing. 1. Threestrand exchange reaction. **Biochemistry**, 31, 5151-5157.
- MESSING, J.; GRONENBORN, B.; MÜLLER-HILL, B.; HANS HOPSCHEIDER, P. (1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a *Hind*III fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74, 3642-3646.
- MEYER R. R.; LAINE, P. S. (1990). The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. **Microbiol Rev.**, 54, 342-380.
- MICHEL, B.; FLORES, M. J.; VIGUERA, E.; GROMPONE, G.; SEIGNEUR, M. (2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98, 8181-8188.
- MIRSHAD, J. K.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2003). Biochemical characterization of a mutant RecA protein altered in DNA-binding loop 1. **Biochemistry**, 42, 5945-5954.
- MISHRA, S.; MAZUMDAR, P. A.; DEY, J.; DAS, A. K. (2003). Molecular modeling of RecX reveals its mode of interaction with RecA. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, 312, 615-622.
- MODRICH, P. (1994). Mismatch repair, genetic stability, and cancer. **Science**, 266, 1959-1960.
- MODRICH, P.; LAHUE, R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. **Annu Rev Biochem.**, 65, 101-133.
- MOOLENAAR, G. F.; VAN ROSSUM-FIKKERT, S.; VAN KESTEREN, M.; GOOSEN, N. (2002). Cho, a second endonuclease involved in *Escherichia coli* nucleotide excision repair. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99, 1467-1472.
- MORIMATSU, K.; TAKAHASHI, M.; NORDEN, B. (2002). Arrangement of RecA protein in its active filament determined by polarized-light spectroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99, 11688-11693.
- NOHMI, T.; BATTISTA, J. R.; DODSON, L. A.; WALKER, G. C. (1988). RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85, 1816-1820.
- OGAWA, T.; YU, X.; SHINOHARA, A.; EGELMAN, E. H. (1993). Similarity of the yeast Rad51 filament to the bacterial RecA filament. **Science**, 259, 1896-1899.

- ORREN, D. K.; SANCAR, A. (1989). The (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* has only the UvrB and UvrC subunits in the incision complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 86, 5237-5241.
- PAGÈS, V.; KOFFEL-SCHWARTZ, N.; FUCHS, R. P. P. (2003). *recX*, a new SOS gene that is co-transcribed with the *recA* gene in *Escherichia coli*. **DNA Repair**, 2, 273-284.
- PALEJWALA, V. A.; PANDYA, G. A.; BHANOT, O. S.; SOLOMON, J. J.; MURPHY, H. S.; DUNMAN, P. M.; HUMAYUM, M. Z. (1994). UVM, an ultraviolet-inducible RecA-independent mutagenic phenomenon in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, 269, 27433-27440.
- PAPAVINASASUNDARAM, K. G.; MOVAHEDZADEH, F.; KEER, J. T.; STOKER, N. G.; COLSTON, M. J.; DAVIS, E. O. (1997). Micobacterial *recA* is cotranscribed with a potencial regulatory gene called *recX*. **Mol. Microbiol.**, 24, 141-153.
- PAPAVINASASUNDARAM, K. G.; COLSTON, M. J.; DAVIS, E. O. (1998). Construction and complementation of a *recA* deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis* *recA* does not effect RecA function. **Mol. Microbiol.**, 30, 525-534.
- PHAM, P.; SEITZ, E. M.; SAVELIEV, S.; SHEN, X.; WOODGATE, R.; COX, M. M.; GOODMAN, M. F. (2002). Two distinct modes of RecA action are required for DNA polymerase V-catalyzed tranlesion synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99, 11061-11066.
- PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F. L.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F; DÖBEREINER, J. (1991). Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, 137, 61-65.
- PUGH, B. F.; COX, M. M. (1987). Stable binding of RecA protein to duplex DNA. Unraveling a paradox. **J. Biol. Chem.**, 62, 1326-1336.
- PUGH, B. F.; COX, M. M. (1988). High salt activation of RecA protein ATPase in the absence of DNA. **J. Biol. Chem.**, 263, 76-83.
- RADMAN M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. **Basic Life Sci.** 5, 355-367.
- REDDY, M. S.; GUHAN, N.; MUNIYAPPA, K. (2001). Characterization of single-stranded DNA-binding proteins from Mycobacteria. The carboxyl-terminal of domain of SSB is essential for stable association with its cognate RecA protein. **J. Biol. Chem.**, 276, 45959-45968.
- REEVE, M. A.; FULLER C. W. (1995). A novel thermostable polymerase for DNA sequencing. **Nature**, 376,796-797.

- REHRAUER, W. M.; BRUCK, I.; WOODGATE, R.; GOODMAN, M. F.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1998). Modulation of RecA nucleoprotein function by the mutagenic UmuD'C protein complex. **J. Biol. Chem.**, 273, 32384-32387.
- REHRAUER, W. M.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1993). Alteration of the nucleoside triphosphate (NTP) catalytic domain within *Escherichia coli* RecA protein attenuates NTP hydrolysis but not joint molecule formation. **J. Biol. Chem.**, 268, 1292-1297.
- REHRAUER, W. M.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1996). The DNA binding site(s) of the *Escherichia coli* RecA protein. **J. Biol. Chem.**, 271, 11996-12002.
- REHRAUER, W. M.; LAVERY, P. E.; PALMER, E. L.; SINGH, R. N.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. (1996). Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor: I. LexA repressor cleavage is competitive with binding of a secondary DNA molecule. **J. Biol. Chem.**, 271, 23865-23873.
- REUVEN, N. B.; TOMER, G.; LIVNEH, Z. (1998). The mutagenesis proteins UmuD' and UmuC prevent lethal frameshifts while increasing base substitution mutations. **Mol. Cell**, 2, 191-199.
- RICE, K. P.; EGGLER, A. L.; SUNG, P.; COX, M. M. (2001). DNA pairing and strand exchange by the *Escherichia coli* RecA and yeast Rad51 proteins without ATP hydrolysis: on the importance of not getting stuck. **J. Biol. Chem.**, 276, 38570-38581.
- ROBU, M. E.; INMAN, R. B.; COX, M. M. (2001). RecA protein promotes the regression of stalled replication forks in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98, 8211-8218.
- ROBU, M. E.; INMAN, R. B.; COX, M. M. (2004). Situational repair of replication forks-Roles of RecG and RecA proteins. **J. Biol. Chem.**, 279, 10973-10981.
- ROCA, A. I.; COX, M. M. (1997). RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, 56, 129-223.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, 234, 779-815.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANCAR, A. (1994a). Structure and function of DNA photolyase. **Biochemistry**, 33, 2-9.
- SANCAR, A. (1994b). Mechanisms of DNA excision repair. **Science**, 266, 1954-1956.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74, 5463-5467.



- SANO, Y. (1993). Role of the *recA*-related gene adjacent to the *rec* gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, 175, 2451-2454.
- SARASTE, M.; SIBBALD, P.R.; WITTINGHOFER, A. (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP binding proteins. **Trends Biochem. Sci.**, 15, 430-434.
- SASSANFAR, M.; ROBERTS, J. W. (1990). Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. **J. Mol. Biol.**, 212, 79-96.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. **Anal. Biochem.**, 199, 223-231.
- SCHLACHER K.; LESLIE, K.; WYMAN, C.; WOODGATE, R.; COX, M. M.; GOODMAN, M. F. (2005). DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome. **Mol. Cell**, 17, 561-572.
- SCHUTTE, B. C.; COX, M. M. (1987). Homology dependent changes in adenosine 5'-triphosphate hydrolysis during RecA protein promoted DNA strand exchange: evidence for long paranemic complexes. **Biochemistry**, 26, 5616-5625.
- SCOPES, R. **Protein Purification - Principles and Practice**. 2 ed. Springer-Verlag, New York, 1988.
- SEITZ, E. M.; BROCKMAN, J. P.; SANDLER, S. J.; CLARK, A. J.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1998). RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. **Genes Dev.**, 12, 1248-1253.
- SHAN, Q.; COX, M. M.; INMAN, R. B. (1996). DNA strand exchange promoted by RecA K72R. Two reaction phases with different  $Mg^{2+}$  requirements. **J. Biol. Chem.**, 271, 5712-5724.
- SHAN, Q.; COX, M. M. (1996). RecA protein dynamics in the interior of RecA nucleoprotein filaments. **J. Mol. Biol.**, 257, 756-774.
- SHAN, Q.; COX, M. M. (1997). RecA filament dynamics during DNA strand exchange reactions. **J. Biol. Chem.**, 272, 11063-11073.
- SHAN, Q.; BORK, J. M.; WEBB, B. L.; INMAN, R. B.; COX, M. M. (1997). RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins. **J. Mol. Biol.**, 265, 519-540.
- SHAN, Q.; COX, M. M. (1998). On the mechanism of RecA-mediated repair of double-strand breaks: No role for four-strand DNA pairing intermediates. **Mol. Cell**, 1, 309-317.

- SHEN, X.; WOODGATE, R.; GOODMAN, M. F. (2003). *Escherichia coli* DNA polymerase V subunit exchange: a post-SOS mechanism to curtail error-prone DNA synthesis. **J. Biol. Chem.**, 278, 52546-52550.
- SHEVELL, D. E.; FRIEDMAN, B. M.; WALKER, G. C. (1990). Resistance to alkylation damage in *Escherichia coli*: role of the Ada protein in induction of the adaptive response. **Mutat. Res.**, 233, 53-72.
- SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; KIMURA, S.; IWASAKI, H.; NAKATA, A. (1988). Structure and regulation of the *Escherichia coli* *ruv* operon involved in DNA repair and recombination. **J. Bacteriol.**, 170, 4322-4329.
- SHIVASHANKAR, G.; FEINGOLD, M.; KRICHEVSKY, O.; LIBCHABER, A. (1999). RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: the role of ATP hydrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96, 7916-7921.
- SIGURDSSON, S.; TRUJILLO, K.; SONG, B. W.; STRATTON, S.; SUNG, P. (2001). Basis for avid homologous DNA strand exchange by human Rad51 and RPA. **J. Biol. Chem.**, 276, 8798-8806.
- SKIBA, M. C.; KNIGHT, K. L. (1994). Functionally important residues at a subunit interface site in the RecA protein from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, 269, 3823-3828.
- SKIBA, M. C.; LOGAN, K. M.; KNIGHT, K. L. (1999). Intersubunit proximity of residues in the RecA protein as shown by engineered disulfide cross-links. **Biochemistry**, 38, 11933-11941.
- SOMMER, S.; BOUDSOCQ, F.; DEVORET, R.; BAILONE, A. (1998). Specific RecA amino acid changes affect RecA-UmuD'C interaction. **Mol. Microbiol.**, 28, 281-291.
- SPIES, M.; BIANCO, P. R.; DILLINGHAM, M. S.; HANDA, N.; BASKIN, R. J.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2003). A molecular throttle: the recombination hotspot  $\chi$  controls DNA translocation by the RecBCD helicase. **Cell**, 114, 647-654.
- STASIAK, A.; DI CAPUA, E. (1982). The helicity of DNA in complexes with RecA protein. **Nature**, 299, 185-186.
- STASIAK, A.; EGELMAN, E. H. (1988). Visualization of recombination reactions, p. 265-308. In R. Kucherlapati, and G. R. Smith (ed.), **Genetic Recombination**. American Society for Microbiology.
- STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; SOUZA, E. M.; MACHADO, H. B.; PEDROSA, F. O. (1993). Cloning of a *recA*-like gene from the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, 39, 1096-1102.



- STOHL, E. A.; BLOUNT L.; SEIFERT, H. S. (2002). Differential cross-complementation patterns of *Escherichia coli* and *Neisseria gonorrhoeae* RecA proteins. **Microbiology**, 148, 1821-1831.
- STOHL, E. A.; BROCKMAN, J.; BURKLE, K. L.; MORIMATSU, K.; KOWALCZYKOWSKI, S. C.; SEIFERT, H. S. (2003). *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities *in vitro* and *in vivo*. **J. Biol. Chem.**, 278, 2278-2285.
- STOHL, E. A.; SEIFERT, H. S. (2001). The *recX* gene potentiates homologous recombination in *Neisseria gonorrhoeae*. **Mol. Microbiol.**, 40, 1301-1310.
- STORY, R. M.; STEITZ, T. A. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. **Nature**, 355, 374-376.
- STORY, R. M.; WEBER, I. T.; STEITZ, T. A. (1992). The structure of the *E. coli* RecA protein monomer and polymer. **Nature**, 355, 318-325.
- SUKCHAWALIT, R.; VATTANAVIBOON, P.; UTAMAPONGCHAI S.; VAUGHN G.; MONGKOLSUK S. (2001). Characterization of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *recX*, a gene that is required for high-level expression of *recA*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 205, 83-89.
- SUNG, P. (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast Rad51 protein. **Science**, 265, 1241-1243.
- SUNG, P.; STRATTON, S. A. (1996). Yeast Rad51 recombinase mediates polar DNA strand exchange in the absence of ATP hydrolysis. **J. Biol. Chem.**, 271, 27983-27986.
- SWEASY, J. B. (2005). RecA kicks PolV into gear. **Nature Struct. Mol. Biol.**, 12, 215-216.
- TANG, M.; BRUCK, I.; ERITJA, R.; TURNER, J.; FRANK, E. G.; WOODGATE, R.; O'DONNELL, M.; GOODMAN, M. F. (1998). Biochemical basis of SOS mutagenesis in *Escherichia coli*: reconstitution of *in vitro* lesion bypass dependent on the UmuD<sub>2</sub>C mutagenic complex and RecA protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95, 9755-9760.
- TANG, M.; PHAM, P.; SHEN, X.; TAYLOR, J. -S.; O'DONNELL, M.; WOODGATE, R.; GOODMAN, M. F. (2000). Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted mutagenesis. **Nature**, 404, 1014-1018.
- TATEISHI, S.; HORII, T.; OGAWA, T.; OGAWA, H. (1992). C-terminal truncated *Escherichia coli* RecA protein RecA5327 has enhanced binding affinities to single- and double-stranded DNAs. **J. Mol. Biol.**, 223, 115-129.

- TAYLOR, A. F.; SMITH, G. R. (2003). RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity. **Nature**, 423, 889–893.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. (1994). Clustal W: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.**, 22, 4673–4680.
- TSANG, S. S.; MUNIYAPPA, K.; AZHDERIAN, E.; GONDA, D. K.; RADDING, C. M.; FLORY, J.; CHASE, J. W. (1985). Intermediates in homologous pairing promoted by RecA protein. Isolation and characterization of active presynaptic complexes. **J. Mol. Biol.**, 185, 295–309.
- UMEZU, K.; CHI, N. W.; KOLODNER, R. D. (1993). Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 90, 3875–3879.
- UMEZU, K.; KOLODNER, R. D. (1994). Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. **J. Biol. Chem.**, 269, 30005–30013.
- VANLOOCK, M. S.; YU, X.; YANG, S.; LAI, A. L.; LOW, C.; CAMPBELL, M. J.; EGELMAN, E. H. (2003a). ATP-Mediated conformational changes in the RecA filament. **Structure**, 11, 187–196.
- VANLOOCK, M. S.; YU, X.; YANG, S.; GALKIN, V. E.; HUANG, H.; RAJAN, S. S.; ANDERSON, W. F.; STOHL, E. A.; SEIFERT, H. S.; EGELMAN, E. H. (2003b). Complexes of RecA with LexA and RecX differentiate between active and inactive RecA nucleoprotein filaments. **J. Mol. Biol.**, 333, 345–354.
- VENKATESH R.; GANESH N.; GUHAN N.; REDDY, M. S.; CHANDRASEKHAR T.; MUNIVAPPA K. (2002). RecX protein abrogates ATP hydrolysis and strand exchange promoted by RecA: insights into negative regulation of homologous recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99, 12091–12096.
- VIEIRA, J.; MESSING, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. **Methods Enzymol.**, 153, 3–11.
- VIERLING, S.; WEBER, T.; WOLFGANG, W.; MUTH, G. (2000). Transcriptional and mutational analyses of *Streptomyces lividans* *recX* gene and its interference with RecA activity. **J. Bacteriol.**, 182, 4005–4011.
- VOLOSHIN, O. N.; RAMIREZ, B. E.; BAX, A.; CAMERINI-OTERO, R. D. (2001). A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: A negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA. **Genes Dev.**, 15, 415–427.

- WAGNER, J.; GRUZ, P.; KIM, S. R.; YAMADA, M.; MATSUI, K. (1999). The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. **Mol. Cell**, 4, 281–326.
- WALKER G. C. (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, 48, 60-93.
- WALKER, J. E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M. J.; GAY, N. J. (1982). Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO J.**, 1, 945-951.
- WEBB, B. L.; COX, M. M.; INMAN, R. B. (1997). Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. **Cell**, 91, 347-56.
- WEINSTOCK, G. M.; MCENTEE, K.; LEHMAN, I. R. (1981). Hydrolysis of nucleoside triphosphates catalyzed by RecA protein of *Escherichia coli* interaction of the RecA protein of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, 256, 8829-8834.
- WEISEMANN, J. M.; FUNK, C.; WEINSTOCK, G. M. (1984). Measurement of *in vivo* expression of the *recA* gene of *Escherichia coli* by using *lacZ* gene fusions. **J. Bacteriol.**, 160, 112-121.
- WEST, S. C. (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. **Annu. Rev. Genet.** 31, 213-244.
- WILLETTS, N. S.; CLARK, A. J. (1969). Characteristics of some multiply recombination-deficient strains of *Escherichia coli*., **J. Bacteriol.**, 100, 231-239.
- WITKIN, E. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. **Bacteriol. Rev.**, 40, 869-907.
- XING, X.; BELL, C.E. (2004). Crystal structures of *Escherichia coli* RecA in a compressed helical filament. **J. Mol. Biol.**, 342, 1471-1485.
- XU, L.; MARIANS, K. J. (2002). A dynamic RecA filament permits DNA polymerase-catalyzed extension of the invading strand in recombination intermediates. **J. Biol. Chem.**, 277, 14321-14328.
- XU, L.; MARIANS, K. J. (2003). PriA mediates DNA replication pathway choice at recombination intermediates. **Mol. Cell**, 11, 817-26.
- YANG, M. K.; CHOU, M. E. (2001). Molecular characterization and expression of the *recX* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Curr. Microbiol.**, 42, 257-263.
- YANG, Y. C.; HSU, C. H.; CHOU, C. P.; YANG, M. K. (2002). Genetic organization of the *lexA*, *recA*, and *recX* genes in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 209, 149-154.

- YASUDA, T.; MORIMATSU, K.; KATO, R.; USUKURA, J.; TAKAHASHI, M.; OHMORI, H. (2001). Physical interactions between DinI and RecA nucleoprotein filament for the regulation of SOS mutagenesis. **EMBO J.**, 20, 1192-1202.
- YONESAKI, T. (1995). Recombination apparatus of T4 phage. **Adv. Biophys.**, 31, 3-22.
- YOSHIMASU, M.; AIHARA, H.; ITO, Y.; RAJESH, S.; ISHIBE, S.; MIKAWA, T.; YOKOYAMA, S.; SHIBATA, T. (2003). An NMR study on the interaction of *Escherichia coli* DinI with RecA-ssDNA complexes. **Nucleic Acids Res.**, 31, 1735-1743.
- YU, X.; EGELMAN, E. H. (1992). Structural data suggest that the active and inactive forms of the RecA filament are not simply interconvertible. **J. Mol. Biol.**, 227, 334-346.
- YU, X.; EGELMAN, E. H. (1993). The LexA repressor binds within the deep helical groove of the activated RecA filament. **J. Mol. Biol.**, 231, 29-40.
- YU, X.; JACOBS, S. A.; WEST, S. C.; OGAWA, T.; EGELMAN, E. H. (2001). Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98, 8419-8424.
- ZAITSEC, E.; ALEXSEYEV, A.; LANZOV, V.; SATIN, L.; CLARK, A. J. (1994). Nucleotide sequence between *recA* and *alaSp* in *E. coli* K12 and the sequence change in four *recA* mutations. **Mutat. Res.**, 323, 173-177.
- ZAITSEV, E. N.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1999). Enhanced monomer-monomer interactions can suppress the recombination deficiency of the *recA142* allele. **Mol. Microbiol.**, 34, 1-9.

## APÊNDICE 1 OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS <sup>§</sup>
<b>Amplificação dos genes <i>recA</i> e <i>recX</i></b>	
Universal (23 mers)	GACGTTGTAAACGACGGCCAGT
Reverso (24 mers)	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
<i>recA1</i> (19 mers)	GAGAGAGA <b>CATATG</b> GCAG
<i>recA2</i> (27 mers)	AGGGAGC <b>GGATCC</b> TCAGGAGGCTTTTCG
<i>recX1</i> (27 mers)	TAATCGAAC <b>CATATG</b> CCCAGACCGCCG
<i>recX2</i> (20 mers)	CGGC <b>GGATCC</b> ATGCCAGAC
<b>Seqüenciamento</b>	
T7 (19 mers)	TAATACGACTCACTATAGG
T7 terminador <sup>¶</sup> (19 mers)	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
<b>Mutagenese sítio-dirigida</b>	
Q54L (26 mers)	GCTCACTGGG <b>CC</b> TGGACATCGCCCTG
Q54L* (26 mers)	CAGGGCGATGTCC <b>A</b> GGCCAGTGAGC
G73A (33 mers)	GTCATCGAGATCTACG <b>CCCC</b> GGAATCCTCGGGC
G73A* (33 mers)	GCCCCAGGATTCCGGG <b>G</b> CGTAGATCTCGATGAC
HMK (36 mers)	CATCATCATCAC <b>CGC</b> <b>CGC</b> <b>CTC</b> GGTGCCGCGCGGC
HMK* (36 mers)	GCCGCGCGGCAC <b>CGAG</b> CGCG <b>GGC</b> GGTGATGATGATG
<b>Ensaio de Retardamento de migração eletroforética</b>	
WVC8 (88 mers)	GAAAGAAAGCCGAGTAGTTTTATTTCAGACGGCTGGCACGACTT TTGCACGATCAGCCCTGGGCGCGCATGCTGTTGCGCATTCATGT
WVC3 (88 mers)	ACATGAATGCGCAACAGCATGCGCGCCCAGGGCTGATCGTGCA AAGTCGTGCCAGCCGTCTGAAATAAACTACTCGGCTTTCTTTC
<b>Ensaio de Interação proteína-proteína</b>	
LHBT-r (40 mers)	AATTCATATGAGAACCACCACCACCAGAACACCACCACC
<b>Ensaio de Ligação covalente proteína-DNA induzida por luz UV</b>	
SRW8 (63 mers)	CAGACGGCTGGCACGACTTTTGACGATCAGCCCTGGGCGCGCA TGCTGTTGCGCATTCATGT
SRW3(-7/-6) (63 mers)	ACATGAATGCGCAACAGCATGCGCGCCCAGGGCT <b>#</b> GATCGTGCA AAAGTCGTGCCAGCCGTCTG

<sup>§</sup> Todas as seqüências estão sendo apresentadas na direção 5'→3'.

<sup>¶</sup> Oligonucleotídeo também utilizado na amplificação do gene *recX*.

Os nucleotídeos sublinhados com um ou dois traços correspondem aos sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, respectivamente.

# indica a posição do enxofre no oligonucleotídeo, grupo alvo da derivatização pelo brometo de azidofenacil

Em negrito estão indicados os nucleotídeos modificados em relação à seqüência original do DNA molde.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados e purificados pela Qiagen, Invitrogen ou Sigma.

## APÊNDICE 2 ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIOS DAS PROTEÍNAS RecA DE *E. coli* e *H. seropedicae*.

	10	20	30	40	50
Ecoli	M-----AIDENKQKALAAALGQIEKQFGKGSIMRLGE-DRSMDVETISTGSLSLDIALGA				
	* :.:*,*****.*****:***: : : :.:*****.*****				
Hserop	MDDKKAANNSEKSKALAAALGQIEKQFGKGSVMRMEDGVIAEEIQAVSTGSLGLDIALGI				
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
Ecoli	GGLPMGRIVEIYGPSSSGKTTTLQVIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPIYARKLGVDIDN				
	*** **.:*****.***** ** *: * ***** **.:***:..:				
Hserop	GGLPRGRVIEIYGPSSSGKTTTLQSIQIAEMQKLGTCAFIDAEHALDVTYAQKLGVLND				
	70	80	90	100	110
	120	130	140	150	160
Ecoli	LLCSQPDTEQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAALTPKAEIEGEIGDSHMGLAARMMSQ				
	** *****.*****:*****:*** ** **.:***				
Hserop	LLISQPDTEQALEICDALVRSGAVDLIVVDSVAALTPKAEIEGDMGDSLPLGLQARLMSQ				
	130	140	150	160	170
	180	190	200	210	220
Ecoli	AMRKLGNLQKSNLTLIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKE				
	*:***:*.:.:.*: *****.*****.*****.*****.***** *:.*.				
Hserop	ALRKLGTGSINRTNTTVIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGSIKS				
	190	200	210	220	230
	240	250	260	270	280
Ecoli	GENVVGSETRVKVVKNKIAAPFKQAEFQILYGEINIFYGELVDLGVKEKLIKAGAWYSY				
	*:.*:***:*****:*.***:*.*:***** . **.:*** :.*:***:*****				
Hserop	GDEVIGSETKVKVVKNKVAPPFREAHDILYGEIGTSREGEILDGSEHKVVEKSGAWYSY				
	250	260	270	280	290
	300	310	320	330	340
Ecoli	KGEKIGQGKANATAWLKDNPETAKEIEKKVRELLSNPNSTPDFSVDDSEGVAETNEDF				
	:**.:*** ** :**.:** *:***:*** * .*:.. :.*. *:..				
Hserop	NGERIGQGKDNARNYLKEHPELAREIENKVRVALG-----VPELAGGEAEAEAKAS---				
	310	320	330	340	350

O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas RecA de *E. coli* (EcRecA) e RecA *H. seropedicae* (HsRecA) no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) permitiu observar que cada resíduo *n* na sequência de EcRecA, corresponde ao resíduo *n*+7 na sequência de HsRecA. A numeração dos aminoácidos da EcRecA está sendo mostrada acima da sua sequência e a da HsRecA, abaixo da sua sequência. A proteína HsRecA mutante L54Q apresenta o resíduo de leucina (em amarelo) substituído por glutamina enquanto que a proteína HsRecA mutante L54Q G73A apresenta a substituição L54Q e a substituição do resíduo de glicina (em azul) por alanina. Aminoácidos idênticos estão indicados por asterisco (\*), substituições conservadas, por dois pontos (:), e substituições semi-conservadas por um ponto (.), considerando os seguintes grupos: AVFPMILW (resíduos pequenos e hidrofóbicos, incluindo os aromáticos), DE (resíduos ácidos), RHK (resíduos básicos), STYHCNGQ (resíduos hidroxil + Amino + básico).

